

PN
**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

**(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro**



**(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. August 2000 (03.08.2000)**

PCT

**(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/45147 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 15/14

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/00621

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. Januar 2000 (26.01.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 03 001.4 26. Januar 1999 (26.01.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EVOTEC BIOSYSTEMS AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, D-22525 Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FUHR, Günter [DE/DE]; Kavalierstrasse 15, D-13187 Berlin (DE). SCHNELLE, Thomas [DE/DE]; Koppenstrasse 65, D-10243 Berlin (DE). REICHLE, Christoph [DE/DE]; Sprengelstrasse 20, D-13353 Berlin (DE). GLASSER, Henning [DE/DE]; Boxhagener Strasse 38, D-10245 Berlin (DE). MÜLLER, Torsten [DE/DE]; Hartriegelstrasse 39, D-12439 Berlin (DE). GRADL, Gabriele [DE/DE]; Thomasiusstrasse 8, D-10557 Berlin (DE).

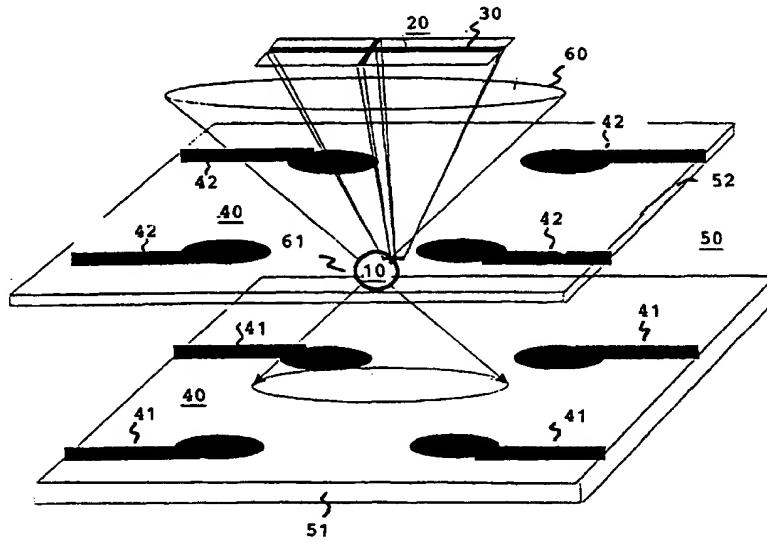
(74) Anwalt: HERTZ, Oliver; V. Bezold & Sozien, Akademiestr. 7, D-80799 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR DETECTING MICROSCOPIC OBJECTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR DETEKTION MIKROSKOPISCH KLEINER OBJEKTE



WO 00/45147 A3

(57) Abstract: The aim of the invention is to detect objects, especially in fluidic microsystems. At least one static or moving object (10) is represented on a structured mask (20) having at least one segment (30) which can transmit light from a planar partial area (80) to a detector. The object (10) is at least partially or temporarily located in said area (80) which has a characteristic dimension that is smaller than the dimension of the object (10) or the displacement path thereof. The amount of light transmitted by the structured mask (20) is detected. A detector signal which exists in a given context in relation to the amount of light is generated. The detector signal is evaluated with respect to the presence of the object (10), the position and shape thereof and/or a temporary modification in the position thereof.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:

30. November 2000

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Zur Objektdetektion erfolgen insbesondere in fluidischen Mikrosystemen eine optische Abbildung mindestens eines ruhenden oder bewegten Objekts (10) auf eine strukturierte Maske (20) mit mindestens einem Segment (30), das dazu eingerichtet ist, Licht von einem flächigen Teilbereich (80), in dem sich das Objekt (10) zumindest teil- oder zeitweise befindet und der eine charakteristische Dimension besitzt, die kleiner als die Dimension des Objekts (10) oder seiner Bewegungsbahn ist, zu einer Detektoreinrichtung zu übertragen, eine Detektion der von der strukturierten Maske (20) übertragenen Lichtmenge und Erzeugung eines Detektorsignals, das in einen vorbestimmten Zusammenhang mit der Lichtmenge steht, und eine Auswertung des Detektorsignals in Bezug auf das Vorhandensein des Objekts (10), seine Position, seine Form und/oder die zeitliche Änderung der Position.

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

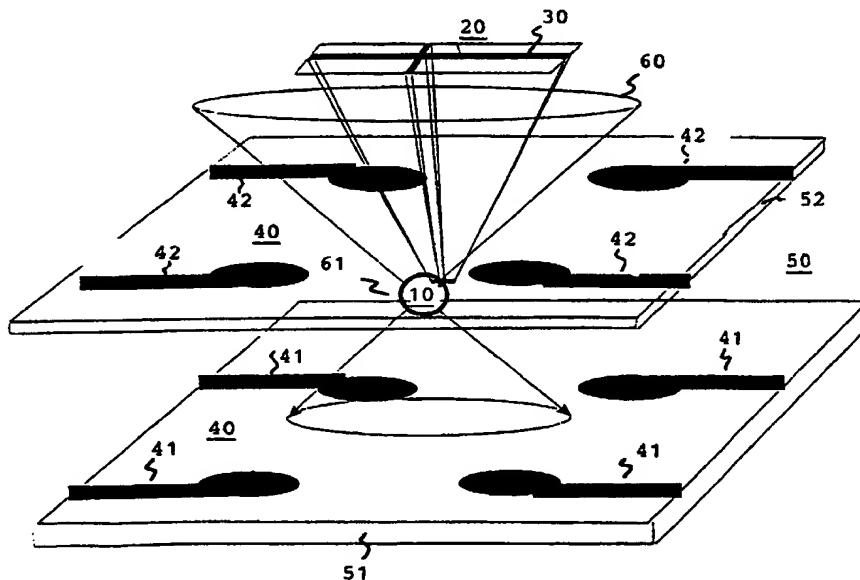
(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 15/14	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/45147
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. August 2000 (03.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/00621		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 26. Januar 2000 (26.01.00)		
(30) Prioritätsdaten: 199 03 001.4 26. Januar 1999 (26.01.99) DE		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): EVOTEC BIOSYSTEMS AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, D-22525 Hamburg (DE).		
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): FUHR, Günter [DE/DE]; Kavalierstrasse 15, D-13187 Berlin (DE). SCHNELLE, Thomas [DE/DE]; Koppenstrasse 65, D-10243 Berlin (DE). REICHLE, Christoph [DE/DE]; Sprengelstrasse 20, D-13353 Berlin (DE). GLASSER, Henning [DE/DE]; Boxhagener Strasse 38, D-10245 Berlin (DE). MÜLLER, Torsten [DE/DE]; Hartiegelstrasse 39, D-12439 Berlin (DE). GRADL, Gabriele [DE/DE]; Thomasiusstrasse 8, D-10557 Berlin (DE).		
(74) Anwalt: HERTZ, Oliver; V. Bezold & Sozien, Akademiestr. 7, D-80799 München (DE).		

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR DETECTING MICROSCOPIC OBJECTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR DETEKTION MIKROSKOPISCH KLEINER OBJEKTE

(57) Abstract

The aim of the invention is to detect objects, especially in fluidic microsystems. At least one static or moving object (10) is represented on a structured mask (20) having at least one segment (30) which can transmit light from a planar partial area (80) to a detector. The object (10) is at least partially or temporarily located in said area (80) which has a characteristic dimension that is smaller than the dimension of the object (10) or the displacement path thereof. The amount of light transmitted by the structured mask (20) is detected. A detector signal which exists in a given context in relation to the amount of light is generated. The detector signal is evaluated with respect to the presence of the object (10), the position and shape thereof and/or a temporary modification in the position thereof.



(57) Zusammenfassung

Zur Objektdetektion erfolgen insbesondere in fluidischen Mikrosystemen eine optische Abbildung mindestens eines ruhenden oder bewegten Objekts (10) auf eine strukturierte Maske (20) mit mindestens einem Segment (30), das dazu eingerichtet ist, Licht von einem flächigen Teilbereich (80), in dem sich das Objekt (10) zumindest teil- oder zeitweise befindet und der eine charakteristische Dimension besitzt, die kleiner als die Dimension des Objekts (10) oder seiner Bewegungsbahn ist, zu einer Detektoreinrichtung zu übertragen, eine Detektion der von der strukturierten Maske (20) übertragenen Lichtmenge und Erzeugung eines Detektorsignals, das in einen vorbestimmten Zusammenhang mit der Lichtmenge steht, und eine Auswertung des Detektorsignals in Bezug auf das Vorhandensein des Objekts (10), seine Position, seine Form und/oder die zeitliche Änderung der Position.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren und Vorrichtung zur Detektion
mikroskopisch kleiner Objekte

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Detektion mikroskopisch kleiner Objekte, insbesondere zur Erfassung der Präsenz und/oder zur Messung des Ortes bzw. der Ortsänderung der Objekte, beispielsweise in fluidischen Mikrosystemen. Die mikroskopisch kleinen Objekte sind insbesondere synthetische oder biologische Teilchen, die in einem fluidischen Mikrosystem manipuliert werden. Die Erfindung betrifft auch Verwendungen des Verfahrens bzw. der Vorrichtung, insbesondere zur Objektdetektion in Abhängigkeit von mechanischen, elektrischen oder chemischen Wechselwirkungen der Objekte mit ihrer Umgebung oder anderen Objekten.

Es ist allgemein bekannt, fluidische Mikrosysteme zur teilchenspezifischen Manipulierung mikroskopisch kleiner Objekte unter der Wirkung hydrodynamischer und/oder elektrischer Kräfte zu verwenden. Die Manipulierung biologischer Teilchen in Mikrosystemen mit hochfrequenten elektrischen Feldern auf der Grundlage negativer Dielektrophorese wird beispielsweise von G. Fuhr et al. in "Naturwissenschaften", Bd. 81, 1994, S. 528 ff., beschrieben. Die Manipulierung der Objekte umfaßt u.a. eine Sortierung nach bestimmten Eigenschaften, eine Objektveränderung unter Wirkung elektrischer Felder (z.B. Zellpopulation), eine chemische Behandlung, eine gegenseitige Zusammenführung und Wechselwirkung der Objekte und dergl. Die Bereitstellung vorbestimmter hydrodynamischer und/oder elektrischer Kräfte erfolgt durch die Gestaltung der Kanalstruktur des Mikrosystems bzw. die geometrische Form von Mikroelektroden zur Ausbildung hochfrequenter elektrischer Felder und deren Ansteuerung.

Die bisher bekannten Mikrosysteme erlauben zwar eine Kontrolle der jeweiligen Objektmanipulierung mit optischen Mitteln, z.B. unter Verwendung eines Mikroskops mit einer Kamera. Diese optische Kontrolle ist jedoch bisher auf visuelle Überprüfungen oder den Einsatz aufwendiger Bilderkennungsverfahren zur Bearbeitung der Kamerabildes beschränkt. Die Bildverarbeitungsverfahren sind jedoch, soll eine Echtzeit-Kontrolle ausübt werden, für die auftretenden Objektgeschwindigkeiten erheblich zu langsam. Dadurch ist bisher die Implementierung automatischer Systemregelungen, bei denen beispielsweise bestimmte Verfahrensverläufe in Abhängigkeit von Ort, Bewegungszustand oder Anzahl beobachteter Objekte erfolgen, ausgeschlossen.

Aus der PCT/EP97/07218 ist ein Verfahren zur Bewegungserfassung an mikroskopischen Objekten bekannt, die eine zumindest teilweise periodische Bewegung ausführen. Dieses Verfahren basiert auf der Anwendung einer Fourier-Analyse eines Detektor-signals, das die Objektbewegung über eine Vielzahl von Bewegungsperioden charakterisiert. Dieses Verfahren stellt eine erhebliche Vereinfachung gegenüber der Anwendung von computer-gestützten Bildverarbeitungsverfahren dar, ist jedoch in der Anwendung auf periodische Bewegungen beschränkt. Im allgemeinen treten in einem Mikrosystem jedoch auch nicht-periodische Bewegungen oder Ruhezustände der Objekte auf, an deren Detektion insbesondere zur automatischen Steuerung eines Mikrosystems ein Interesse besteht.

Es ist auch bekannt, die Präsenz von kleinen Teilchen in Suspensionen auf der Basis von Streulichtmessungen zu erfassen. Dieses Prinzip lässt sich jedoch nur bei einer Vielzahl von Teilchen und somit teilchenunspezifisch realisieren. Außerdem lassen sich keine Angaben über den Bewegungszustand von Teilchen (Ort, Geschwindigkeit oder dgl.) ableiten.

Es ist die Aufgabe der Erfindung ein verbessertes Verfahren zur Objektdetektion anzugeben, das auf beliebige Bewegungs- oder Ruhezustände der zu erfassenden Objekte anwendbar ist und eine schnelle und sichere Signalauswertung ermöglicht. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, Vorrichtungen zur Implementation eines derartigen Verfahrens und neue Verwendungen der erfindungsgemäßen Objektdetektion anzugeben.

Diese Aufgaben werden durch ein Verfahren und eine Vorrichtung mit den Merkmalen gemäß den Ansprüchen 1 bzw. 10 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Verwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Der Erfindung liegt die Idee zugrunde, den Aufenthaltsbereich (Bewegungsbahn oder Position) des zu detektierenden Objekts vergrößert auf eine Maske abzubilden, die in mindestens einem Segment zur Übertragung (Reflexion oder Transmission) des Lichtes von einem Teil des Aufenthaltsbereiches (sogenannter Teilbereich) eingerichtet ist und im übrigen außerhalb des Segments eine Übertragung unterbindet. Das mindestens eine lichtübertragende Segment der Maske besitzt eine charakteristische Dimension, die kleiner als die Abbildung des Gesamtobjekts oder als die laterale Ausdehnung der Bewegungsbahn des Objekts ist. Die von der Maske übertragene Lichtmenge der Objektabbildung wird summarisch auf eine Detektoreinrichtung abgebildet, an der ein Detektorsignal erzeugt wird, das in einem vorbestimmten Zusammenhang mit der detektierten Lichtmenge steht und eine Auswertung in Bezug auf die Präsenz (Vorhandensein) eines Objekts, dessen Position und/oder die zeitliche Änderung der Position erlaubt. Durch die maskierte Abbildung eines Teilbereichs des Objekts und/oder der Objektbahn wird die von der Detektoreinrichtung erfaßte Lichtmenge in charakteristischer Weise moduliert. Die Zeitabhängigkeit des Detektorsignals, insbesondere die zeitliche Lage von

Signalmaxima, die Amplituden der Signalmaxima und der zeitliche Amplitudenverlauf in Umgebung der Signalmaxima, liefert nicht nur Angaben über den Ort und die Geschwindigkeit der Objekte, sondern auch über abgeleitete Größen wie beispielsweise die Frequenz periodischer Bewegungen, quantitative Angaben zu Teilchenzahlen, die Bewegungsrichtung, die Zentrierung in Mikrosystemen oder dergleichen.

Gegenstand der Erfindung ist somit insbesondere die Objektdektion auf der Grundlage eines Blenden-Meßprinzips, bei dem eine summarische Lichtmengendetektion des von einem Teilbereich des Objekts oder der Objektbahn ausgehenden Lichts erfolgt. Dementsprechend kann die Objektteilabbildung grundsätzlich auf eine Blende geeigneter Dimensionierung erfolgen. Im einfachsten Falle besteht die Maske aus einem lichtundurchlässigen Element mit einer runden oder eckigen Öffnung, die zur Realisierung der erfindungsgemäßen Teilabbildung des zu detektierenden Objekts geeignet dimensioniert ist.

Entsprechend bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung besitzt jedoch die Maske eine Segmentierung mit einer vorbestimmten Geometrie. Das mindestens eine Segment zur Übertragung des Lichtes der Teilabbildung besitzt eine geometrische Form, die anwendungsabhängig je nach den an der jeweiligen Meßstelle erwarteten Objektbewegungen (z.B. Translation, Rotation, translatorische Vibration, rotatorische Vibration oder dgl.) ausgewählt ist.

Erfindungsgemäß ist vorzugsweise eine vergrößerte Abbildung des Aufenthaltsbereichs der zu detektierenden Objekte (z.B. in einem Mikrosystem) auf die Maske vorgesehen. Damit kann die Segmentierung der Maske, die zwar zur Übertragung des Lichts von einer Teilabbildung eingerichtet ist, absolut größer als der betreffende Teilbereich oder des Teils des Objekts sein.

Dies ist für die Herstellung und Justierung der Maske von Vorteil.

Bevorzugte Anwendungen der erfindungsgemäßen Objektdetektion sind in den fluidischen Mikrosystemen insbesondere bei der automatischen Reglung von Systemfunktionen, bei der dielektrischen Einzelteilchenspektroskopie und bei der Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Objekten und anderen Objekten und/oder Substraten gegeben. Erfindungsgemäß detektierte Objekte besitzen charakteristische Durchmesser im Bereich unterhalb 500 µm bis in den 100 nm-Bereich und umfassen synthetische oder biologische Teilchen (oder Teilchenaggregate). Die synthetischen Teilchen sind beispielsweise membranumhüllte Gebilde, wie Liposomen oder Vesikeln, oder Kunststoffpartikel (sogenannte Beads). Die biologischen Teilchen sind biologische Zellen oder Zellaggregate oder Zellbestandteile, Mikroorganismen, Viren oder dergleichen.

Gegenstand der Erfindung ist auch eine Vorrichtung zur Implementierung der erfindungsgemäßen Objektdetektion, umfassend eine optische Abbildungseinrichtung zur Abbildung eines Teils eines zu erfassenden Objekts (oder von dessen Bahn) über eine Maske auf eine Detektoreinrichtung, die ein Detektorsignal in bestimmtem Zusammenhang mit der erfaßten Lichtmenge erzeugt, und eine Auswertungseinrichtung zur Ermittlung von Eigenschaften des Bewegungs- oder Ruhezustandes des Objekts. Die Abbildungseinrichtung enthält insbesondere die Maske, auf die das Objekt oder dessen Bewegungsbahn vergrößert abgebildet wird und die nur einen Teilbereich der Abbildung an die Detektoreinrichtung überträgt. Gemäß einer bevorzugten und unten im einzelnen erläuterten Ausführungsform der Erfindung ist die Maske eine Blende mit einer vorbestimmten Transmissionsgeometrie. Die Erfindung ist jedoch nicht auf diese Gestaltung beschränkt, sondern auch mit anderen Maskengestaltungen imple-

mentierbar, die für die Erfüllung derselben Funktion wie die transmittierende Blende eingerichtet sind. Als Maske kann anstelle eines lichtdurchlässigen Segments in einem lichtundurchlässigen Maskenmaterial auch ein lichtundurchlässiges Segment (mit derselben Geometrie wie das zuvor genannte lichtdurchlässige Segment) in einer im übrigen lichtdurchlässigen Umgebung verwendet werden. Entsprechend ist auch anstelle des Transmissions- ein Reflexionsprinzip realisierbar.

Die Abbildungseinrichtung ist vorzugsweise Teil einer an sich bekannten Mikroskopanordnung, die im Strahlengang die Maske zur Erzeugung der Teilabbildung enthält. Damit kann simultan zur Objektdetektion eine visuelle Objektbeobachtung stattfinden. Die Kombination mit der Mikroskopanordnung ist jedoch nicht zwingend erforderlich. Insbesondere für automatisierte Anwendungen kann die Abbildungseinrichtung unmittelbar an einem Mikrosystem vorgesehen sein.

Die Erfindung besitzt die folgenden Vorteile. Die erfindungsgemäße Objektdetektion erfordert keine meß- und zeitaufwendigen Bildverarbeitungsverfahren. Sie ermöglicht eine hochgenaue Messung mit an sich verfügbaren Abbildungs- und Meßeinrichtungen. Ein bestehender Mikroskopaufbau kann ohne weiteres durch Anbringung der genannten Maske für die erfindungsgemäße Objektdetektion eingerichtet werden. Die erfindungsgemäße Maskensegmentierung erlaubt eine Objektdetektion ohne großen Justieraufwand. Die Objektdetektion ist einfach automatisierbar. Besondere Vorteile ergeben sich bei der Kombination der maskenbasierten Detektion mit der dielektrischen Einzelteilchenspektroskopie zur hochgenauen Ermittlung dielektrischer Teilcheneigenschaften aus den Bewegungseigenschaften der Teilchen in hochfrequenten elektrischen Feldern. Durch Einsatz vorbestimmter Maskentypen kann eine erfindungsgemäße Vorrichtung problemlos an die Detektion der verschiedensten Bewegungsarten angepaßt werden, ohne daß auf Bildverarbeitungsmethoden zu-

rückgegriffen oder ein Systemumbau durchgeführt werden muß. Es ist genügend, wenn die Detektoreinrichtung einen einzelnen Detektor enthält, dessen Meßsignale seriell verarbeitet werden können. Dies erlaubt eine Verarbeitung in Echtzeit, was insbesondere für Schalter- und Sortieranwendungen in Mikrosystemen von Bedeutung ist.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung ergibt sich aus der geometrischen Maskenstrukturierung. Im Unterschied zum herkömmlichen "Pin-Hole"-Meßprinzip sind die Maskensegmente zwar kleiner als die Abbildung des Gesamtobjekts gestaltet, jedoch abweichend von Lochblenden (wie sie beispielsweise für die Konfokalmikroskopie bekannt sind) flächig ausgebildet. Damit wird eine erhöhte Funktionssicherheit auch bei in der Praxis auftretenden Abweichungen der Objekte von den erwarteten Bewegungsbahnen erzielt. Die Maskensegmentierung erlaubt es, Toleranzen beim Objektlauf zu kompensieren.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung werden im folgenden unter Bezug auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben. Es zeigen:

Fign. 1A, 1B

eine schematische Perspektivansicht einer Mikroelektrodenanordnung zur Illustration des erfindungsgemäßen Detektionsprinzips am Beispiel einer ersten Maskenform,

Fign. 2 bis 12

schematische Draufsichten auf Mikroelektrodenanordnungen zur Illustration weiterer Maskenformen, wobei im unteren Teil der Figuren charakteristische Verläufe der Detektorsignale dargestellt sind,

- Fign. 13A, 13B bis 15 schematische Perspektivansichten von Mikroelektrodenanordnungen zur Illustration der Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen einem Test-objekt und einem Substrat oder einem anderen Objekt,
- Fign. 16 bis 18 schematische Perspektivansichten von Mikroelektrodenanordnungen zur Illustration einer Kräfte- oder Feldmessung im Mikrosystem, und
- Fig. 19 eine Blockdarstellung eines Ausführungsbeispiels der erfindungsgemäßen Detektoreinrichtung.

Die Erfindung wird im folgenden am Beispiel fluidischer Mikrosysteme zur Manipulierung synthetischer oder biologischer Teilchen beschrieben. Die Realisierung der Erfindung ist nicht an bestimmte Teilchentypen gebunden. Allerdings ist es bei bestimmten Anwendungen erforderlich, daß die Teilchen eine abbildbare Oberflächenstruktur (wie z.B. Strukturen auf biologischen Zellen) besitzen. Falls dies nicht von vorneherein gegeben ist, können die Teilchen aber auch mit einer Strukturierung (z.B. mit einer Fluoreszenzmarkierung) versehen werden. Die Mikrosysteme besitzen eine Kanalstruktur mit typischen Querdimensionen im μm -Bereich und typischen Längsdimensionen im mm-Bereich. An den Kanalwänden sind Mikroelektroden mit vorbestimmten Elektrodenformen und -anordnungen angebracht, die dazu eingerichtet sind, mit hochfrequenten Spannungen (Frequenzen im kHz- bis MHz-Bereich, Amplituden im mV- bis V-Bereich) beaufschlagt zu werden, um die in einer Suspension in den Kanälen strömenden oder ruhenden Teilchen elektrischen Feldern auszusetzen. Unter der Wirkung der elektrischen

Felder erfolgt auf die Teilchen eine vorbestimmte Kraftausübung auf der Basis der negativen oder positiven Dielektrophorese. Weitere Einzelheiten dieser fluidischen Mikrosysteme sind an sich bekannt und werden daher im folgenden nicht beschrieben. Es wird ferner betont, daß die Erfindung nicht auf die fluidischen Mikrosysteme beschränkt, sondern auch bei anderen Anwendungen realisierbar ist, bei denen einzelne Objekte, insbesondere mikroskopisch kleine Objekte, spezifisch in Bezug auf ihre Präsenz, ihre Position und ihre Geschwindigkeit erfaßt werden sollen.

Fig. 1A zeigt in schematischer Perspektivansicht einen Ausschnitt eines Mikrosystems mit einem Kanal 50, von dessen Wänden nur der Kanalboden 51 und die Kanaldecke 52 dargestellt sind und der beispielsweise (in der Darstellung von vorn nach hinten) von einer Teilchensuspension durchströmbar ist. Die Elektrodenanordnung 40 ist eine Oktopolanordnung mit je vier Mikroelektroden 41 am Kanalboden 51 und je vier Mikroelektroden 42 an der Kanaldecke 52. Mit der Elektrodenanordnung 40 wird in an sich bekannter Weise ein rotierendes elektrisches Feld (Drehfeld) erzeugt, in dessen Zentrum das Teilchen 10 im Fokus 61 eines Fanglasers 60 gehalten wird. Der Fanglaser 60 ist Teil einer sogenannten optischen Pinzette (oder: Laser-Tweezer), wie sie an sich bekannt ist.

Mindestens eine Wand des Kanals 50 (z.B. die Kanaldecke 52) ist optisch transparent. Auf der Seite der transparenten Kanalwand, die eine Dicke kleiner oder gleiche 250 µm besitzt, ist eine erfindungsgemäße Abbildungseinrichtung vorgesehen, die zur Abbildung eines Teilbereiches 80 des Aufenthaltsbereiches (in diesem Fall: des Zentrums der Elektrodenanordnung 40) des Teilchens 10 auf einer Detektoreinrichtung vorgesehen ist. Das wesentliche Element der im übrigen nicht dargestellten Abbildungseinrichtung ist die Maske 20 in Gestalt einer im wesentlichen ebenen Blende mit einer vorbestimmten geometrischen

Transmissionsform. Beim dargestellten Beispiel ist die Transmissionsform die Gestalt von sich kreuzenden Streifen. Die Streifen bilden die Segmente 30 der Maske 20. Generell sind die Segmente der Maske erfindungsgemäß vorzugsweise flächig oder zweidimensional angeordnet, um die Informationen über die Teilchenorte bzw. deren Änderungen zu erhalten.

Der Aufenthaltsbereich des Teilchens 10 und somit auch der Teilbereich 80 bzw. ein Teil des Teilchens 10 wird mit (nicht dargestellten) optischen Elementen auf die Ebene der Maske 20 abgebildet. Die Maske 20 überträgt einen Teil des die Abbildung des Teilchens 10 bildenden Lichtes hin zum (ebenfalls nicht dargestellten) Detektor. Bei Veränderung des Ortes des Teilchens 10 im Mikrosystem wird entsprechend auch das am Detektor von der Maske 20 summarisch empfangene Licht entsprechend den aktuell auf die Maskenebene abgebildeten Teilchenstrukturen moduliert. Die Teilchenstrukturen umfassen beispielsweise hellere und dunklere Bereiche der Teilchenabbildung. Bei einer Bewegung des Teilchens überträgt die in Bezug auf das Mikrosysteme ortsfeste Maske 20 je nach der auf die Segmente abgebildeten Bildhelligkeit eine größere oder kleinere Lichtmenge zum Detektor.

Die Abbildung des Teilchens auf die Maskenebene ist eine vergrößernde Abbildung. Der Vergrößerungsfaktor wird anwendungsabhängig gewählt und beträgt beispielsweise bei Mikrosystem-Mikroskop-Kombinationen rd. 10 bis 20, z.B. 15. Charakteristische Dimensionen der Segmente 30 der Maske liegen im Bereich von rd. 100 µm (Streifenlänge).

In Fig. 1B ist eine entsprechende Anordnung in Draufsicht illustriert. Zur dielektrischen Einzelteilchenspektroskopie soll die Rotation des Teilchens 10 in Abhängigkeit von der Amplitude und/oder Frequenz des Drehfeldes erfaßt werden. Aus der Winkelgeschwindigkeit des Teilchens 10 lassen sich Aussa-

gen über dessen dielektrischen Eigenschaften ermitteln. Das Drehfeld kann kontinuierlich umlaufen oder (wie dargestellt) einen laufenden Richtungswechsel aufweisen, so daß sich gegenüber einer mittleren Lage beidseitige Vibrationen in die Teilchenzustände 11a, 11b ergeben. Der mit dem Kreuz entsprechend der Maskenform abgedeckte Teilbereich 80 wird über die Maske abgebildet. Das von der Maske übertragene Licht wird entsprechend der genannten Vibration moduliert. Dem Detektorsignal kann damit unmittelbar die Vibrationsfrequenz entnommen und der Auswertung zugeführt werden.

Fig. 2 illustriert eine Anwendung der Erfindung mit einer abgewandelten Maskengestaltung. Es wird darauf hingewiesen, daß in den Illustrationen der Fign. 2 bis 12 die Masken jeweils nicht dargestellt sind. Allerdings sind jeweils die Teilbereiche des Aufenthaltsbereichs der zu detektierenden Teilchen eingezeichnet, von denen Licht von der Maske übertragen wird. Die entsprechenden Maskensegmente besitzen die gleiche geometrische Form, sind jedoch wegen der eingeführten vergrößernden Abbildung größer als die eingezeichneten Teilbereiche ausgeführt. Die Maske ist so strukturiert, daß das Licht vom Teilbereich 80 des Mikrosystems mit oder ohne dem Teilchen 10 zur Detektoreinrichtung übertragen wird.

Die Gestaltung gemäß Fig. 2 dient der Objektdetektion zur Messung dielektrophoretischer Eigenschaften des Teilchens 10. Das Teilchen 10 befindet sich innerhalb einer Mikroelektrodenanordnung 40, von der nur die Elektroden 41 am Kanalboden 51 schematisch dargestellt sind. Diese Elektrodenanordnung kann wiederum durch vier Elektroden an der Kanaldecke zu einem Oktopol ergänzt werden. Es sind auch andere Mehrelektrodenanordnungen möglich. Bei anwendungsabhängig gewählten Frequenzen der Elektrodenspannungen wird das Teilchen 10 in Abhängigkeit von der äußeren Leitfähigkeit und den dielektrischen Teilcheneigenschaften verschieden schnell durch Abstoßung bzw. An-

ziehung zwischen den Elektroden bewegt. Diese Bewegung erfolgt beispielsweise periodisch. Das Teilchen läuft in Abhängigkeit von seiner Schwingungsfrequenz entlang den mit Pfeilen dargestellten Richtungen (oder auch in andere Richtungen) durch den Teilbereich 80, der gerade der Transmissionsgeometrie der Maske entspricht. Das Detektorsignal (willkürliche Einheiten) wird somit frequenzabhängig moduliert, wie dies im unteren Teil von Fig. 2 angegeben ist. Der Signalverlauf D1 entspricht einer bestimmten Frequenz und einer langsamen Bewegung des Teilchens 10 zwischen den Elektroden 41. Der Signalverlauf D2 zeigt die gleiche Frequenz, jedoch eine geringere Breite der Maxima des Detektorsignals. Dies entspricht einer vergrößerten Bewegungsgeschwindigkeit des Teilchens 10 (und einer vergrößerten Auslenkung).

Fig. 3 illustriert eine weitere Maskengestaltung, bei der die Maske aus vier voneinander getrennten, viereckigen Segmenten besteht, die so angeordnet sind, daß die Teilbereiche 80a bis 80d auf diese Segmente abgebildet werden. Damit kann die Aufenthaltsdauer des Teilchens 10 an den Elektroden 41 bei periodischer Bewegung (analog zu Fig. 2) gemessen werden. Die Segmente dienen jeweils als Teil-Masken zur Objektdetektion. Das vom Detektor ermittelte Detektorsignal umfaßt summarisch die von allen Segmenten übertragenen Lichtmengen. Wiederum können lange Aufenthaltsdauern (D1) von kurzen Aufenthaltsdauern (D2) entsprechend dem unteren Teil von Fig. 3 unterschieden werden.

Fig. 4 illustriert die Objektdetektion zur Erfassung geringster thermischer oder hydrodynamischer Schwingungen eines Teilchens 10 zwischen den Elektroden 41. Die Maske besitzt eine gitterförmige Segmentanordnung, so daß das Licht von dem Teilbereich 80 im Mikrosystem auf den Detektor übertragen wird. Der untere Teil von Fig. 4 illustriert die Möglichkeit der Unterscheidung stärkerer Teilchenvibrationen, die zu einem

hochfrequenten Rauschen D1 führen, von geringeren Vibratoren mit einer geringeren Rauschfrequenz (Verlauf D2).

Fig. 5 illustriert eine Ausführungsform der Erfindung, bei der die Präsenz von Teilchen in einer Aufreihelektrodenanordnung geprüft wird. Die Elektrodenanordnung 40 besteht in diesem Fall aus Elektrodenbändern 43, die nach Art einer Dreiecksfunktion geformt sind. In Fig. 5 sind wiederum nur die Elektrodenbänder 43 auf dem Kanalboden 51 dargestellt. Der Kanal wird in Pfeilrichtung durchströmt. Die Elektrodenbänder 43 werden so angesteuert, daß sich in periodischen Abständen Feldminima bilden, in denen sich die Teilchen 10a bis 10d anordnen sollen.

Die Maske besteht aus einer Gruppe von Segmenten, deren Zahl der Anzahl von Feldminima der Elektrodenanordnung 40 entspricht. Jedes Segment bildet einen quadratischen Rahmen. Die Segmente der Maske sind so angeordnet, daß Licht von den Teilbereichen 80a bis 80d des Mikrosystems über die Maske auf dem Detektor abgebildet wird. Je nach den Beleuchtungsverhältnissen ergibt sich bei Präsenz eines Teilchens in einem Feldminimum ein bestimmter Beitrag zum summarischen Detektorsignal, das bei der dargestellten Aufreihung von vier Teilchen 10 vier vorbestimmte Amplituden einnehmen kann. Wenn die Aufreihelektrodenanordnung beispielsweise vollständig mit Teilchen gefüllt ist, wird die maximale Amplitude erreicht, was im Verlauf D1 mit der durchgezogenen Linie illustriert wird. Sind hingegen alle Feldminima teilchenfrei, so ergibt sich die geringste Amplitude, die im Verlauf D1 gepunktet gezeichnet ist. Alternativ zur Erfassung der Amplitude des Detektorsignals können auch Schwankungen der Amplitude gemessen werden. Dies ist mit dem Verlauf D2 illustriert. Aus diesem sogenannten Varianzeffekt lassen sich entsprechend Aussagen über die Stabilität der Teilchen in der Aufreihelektrodenanordnung treffen.

Eine abgewandelte Maskengestaltung zur Überprüfung des Teilchenaufreihung ist in Fig. 6 illustriert. Die Maske besteht aus streifenförmigen, voneinander beabstandeten Segmenten, die die Teilbereiche 80a bis 80h des Mikrosystems auf dem Detektor abbilden. Die Segmentstreifen besitzen abwechselnd verschiedene Längen und sind so angeordnet, daß die längeren Segmentstreifen die Teilbereiche 80a, 80c, 80e und 80g entsprechend den Feldminima zwischen den Elektrodenbändern 43 und die kürzeren Segmentstreifen die Teilbereiche 80b, 80d, 80f, 80h des Mikrosystems erfassen. Das Detektorsignal besitzt wiederum einen Verlauf, der im wesentlichen der Darstellung im unteren Teil von Fig. 5 entspricht, wobei jedoch zusätzliche Amplitudenstufen entsprechend der Teilchendetektion an den Orten zwischen den Feldminima auftreten.

Fig. 7 illustriert das Prinzip der erfindungsgemäßen Erfassung der Bewegungsrichtung. Der obere Teil von Fig. 7 ist eine schematische Draufsicht auf einen Kanal, bei der an den Kanalboden 51 angrenzend auch die Kanalseitenwände 53, 54 illustriert sind. Die Maske besitzt eine T-förmige Transmissionsteometrie und wird durch zwei gerade streifenförmige Segmente gebildet, von denen ein längeres Segment in Kanallängsrichtung (entsprechend den Pfeilrichtungen) ausgerichtet und ein kürzerer Segmentstreifen dazu senkrecht am Ende des längeren Segmentstreifens verläuft. Die Abbildung auf der Maske führt zur Übertragung des Lichtes von dem T-förmigen Teilbereich 80 des Mikrosystems zum Detektor.

Das Detektorsignal besitzt dann je nach Bewegungsrichtung einen der im unteren Teil von Fig. 7 dargestellten Verläufe. Das Teilchen 10a, das sich von links nach rechts bewegt, trägt zunächst beim Längsstreifen 80a und dann beim Querstreifen 80b zum Detektorsignal bei, das entsprechend dem Verlauf D1 beim Teilchendurchlauf zunächst langsam ansteigt und nach Passage

des Teilchens 10a am Querstreifen 80b schnell abfällt. Für das Teilchen 10b, das sich von rechts nach links bewegt, ergeben sich die umgekehrten Verhältnisse. Das Detektorsignal steigt entsprechend dem Verlauf D2 zuerst schnell an und fällt dann langsam ab. Das Detektorsignal besitzt somit einen charakteristischen Zeitverlauf, der eine Aussage über die Bewegungsrichtung der Teilchen im Kanal zuläßt.

Eine erfindungsgemäße Maske kann auch so gestaltet sein, daß Formunterschiede von Teilchen im Mikrosystem detektiert werden können. Dies ist in Fig. 8 illustriert, die wiederum eine Draufsicht auf einen Kanal mit dem Kanalboden 51 und den Kanalseitenwänden 53, 54 zeigt. Im Kanal bewegen sich Teilchen 10a, 10b und 10c mit verschiedenen Geometrien.

Die Maske besteht aus zwei streifenförmigen Segmenten, die jeweils halbkreisförmig gebogen sind und sich an ihren Scheitelpunkten berühren. Dadurch erlaubt die Maske die Übertragung des vom Teilbereich 80 des Mikrosystems ausgehenden Lichts zum Detektor. Je nach dem zeitlichen Verlauf des Detektorsignals können die jeweils am Teilbereich 80 vorbeigetretenen Teilchenformen unterschieden werden. Dies ist im unteren Teil von Fig. 8 illustriert.

Das längliche Teilchen 10a erzeugt einen Signalverlauf D1, da das Detektorsignal für eine verhältnismäßig lange Zeit moduliert wird, jedoch wegen der geringen Querausdehnung des Teilchens 10a nur eine geringe Amplitude besitzt. Bei einem runden Teilchen 10b, an dessen Gestalt die halbkreisförmige Krümmung der Maskensegmente angepaßt ist, ergibt sich der Verlauf D2. Der Eintritt des Teilchens 10b in den Teilbereich 80 verursacht einen schnellen Signalanstieg. Entsprechendes gilt für den Fall, wenn das Teilchen 10b den Teilbereich 80 verläßt. Schließlich führt das Teilchen 10c (Pärchen) zu einem Signalverlauf D3, der sich wegen der größeren Längsausdehnung gegen-

über dem Teilchen 10b über einen größeren Zeitbereich erstreckt und wegen der größeren Querausdehnung im Vergleich zum Teilchen 10a eine höhere Amplitude erreicht.

Die oben unter Bezug auf Fig. 2 erläuterte Maskenform kann auch zur Partikelzählung verwendet werden, wie dies in Fig. 9 illustriert ist. Die Maske enthält zwei Segmente, die zur Übertragung von Licht aus den Teilbereichen 80a, 80b eingerichtet sind und jeweils die Form eines quadratischen Rahmens besitzen. Die Teilbereiche 80a, 80b sind in Kanallängsrichtung mit einem vorbestimmten Abstand angeordnet. Die Wahl des Abstandes und der Größe der Teilbereiche 80a, 80b (bzw. der entsprechenden Maskensegmente) wird in Abhängigkeit von den auftretenden Teilchengrößen und der Strömungsgeschwindigkeit im Kanal gewählt. Die Teilchenzählung kann sogar gruppenselektiv erfolgen.

So verursacht das kleinste Teilchen 10a den Signalverlauf D1 mit zwei getrennten Maxima entsprechend dem Vorbeitritt des Teilchens 10a an jedem der Teilbereiche 80a, 80b. Bei dem mittleren Teilchen 10b ergibt sich der Signalverlauf D2, bei dem die Maxima ineinander verlaufen. Bei genügend großen Teilchen 10c mit einer charakteristischen Größe, die mit dem Abstand der Teilbereiche 80a, 80b vergleichbar ist, ergibt sich der Signalverlauf D3 mit einem einzelnen Maximum. Die Signalverläufe D1 und D2 können zusätzlich zur Ermittlung der Teilchengeschwindigkeit aus dem Abstand der Maxima verwendet werden.

Fig. 10 zeigt wiederum eine Draufsicht auf einen Kanal mit dem Kanalboden 51 und den Kanalseitenwänden 53, 54. Im Kanal bewegen sich mit der strömenden Suspensionsflüssigkeit Teilchen 10a, 10b entsprechend der Pfeilrichtung. Die erfindungsgemäße Objektdetektion ist hier so ausgelegt, daß ermittelt wird, ob sich ein Teilchen in Kanalmitte oder mehr am Rand des Mikroka-

nals bewegt. Hierzu besitzt die Maske zwei Segmente aus geraden, sich kreuzenden Streifen, die so angeordnet sind, daß das Licht von den Teilbereichen 80a, 80b des Mikrosystems zum Detektor übertragen wird. Die Teilbereiche 80a, 80b erstrecken sich jeweils als gerade Streifen über die gesamte Breite des Kanals und sind gegenüber der Kanalquerrichtung geneigt, so daß sich eine X-Gestalt mit einem Kreuzungspunkt der Streifen in der Kanalmitte ergibt.

Eine Detektion durch eine Maske, die das Licht von derart gewählten Teilbereichen 80a, 80b überträgt, ergibt einen Signalverlauf D1 mit einem einzelnen Maximum, falls das Teilchen 10b sich in der Kanalmitte bewegt, oder einen Signalverlauf D2, falls sich das Teilchen 10a am Kanalrand bewegt, so daß jeder Teilbereich 80a, 80b zweimal gekreuzt wird.

Eine ähnliche Überprüfungsfunktion ist in Fig. 11 illustriert, die eine Draufsicht auf einen Kanal mit Fokussierelektroden 44 auf dem Kanalboden 51 darstellt. Die Fokussierelektroden 44 bilden bei Beaufschlagung mit hochfrequenten Spannungen Feldbarrieren, die die Teilchen 10a nicht durchdringen können, so daß in Zusammenwirkung mit der Strömungskraft eine Teilchenbewegung hin zur Kanalmitte erfolgt. Falls eine der Fokussierelektroden 44 ausfällt, so können Teilchen 10b außerhalb der Mitte an den Elektroden vorbeitreten.

Um eine derartige Fehlfunktion der Fokussierelektroden 44 zu ermitteln, wird die Maske so gestaltet, daß wiederum Teilchen am Kanalrand von Teilchen in der Kanalmitte unterschieden werden können. Hierzu besitzt die Maske drei Segmente, die zwei gerade streifenförmige Segmente und ein punktförmiges Segment umfassen und in einer geraden Reihe quer zur Kanallängsrichtung angeordnet sind. Diese Segmente sind dazu eingerichtet, das Licht von den Teilbereichen 80a, 80b, 80c des Mikrosystems zum Detektor zu übertragen. Je nach der Passage der Teilchen

10a durch die Mitte oder der Teilchen 10b durch die Ränder des Kanals ergeben sich die im unteren Teil von Fig. 11 gezeigten Signalverläufe. Der Signalverlauf D1 zeigt eine hohe Amplitude, d.h. eine starke Modulation des Detektorsignals. Dies zeigt an, daß Teilchen 10b die Teilbereiche 80a oder 80c durchlaufen haben und somit eine oder beide der Fokussierelektroden 44 ausgeschaltet oder defekt sind. Der Signalverlauf D2 hingegen zeigt eine geringe Modulation entsprechend der Teilchenpassage durch die Kanalmitte. Das Signal entsprechend dem Signalverlauf D2 kann wiederum als Zählsignal für die Zahl der Teilchen 10b, die die Fokussieranordnung passiert haben, verwendet werden.

Eine Maske, wie sie in Bezug auf Fig. 2 beschrieben wurde, kann auch zur Überprüfung der Funktion einer Ablenkelektrode 45 verwendet werden. Diese Anwendung der Erfindung ist in Fig. 12 illustriert. Die Ablenkelektrode 45 ist eine Mikroelektrode auf dem Kanalboden 51 in Form eines gekrümmten Elektrodenstreifens. Die Ablenkelektrode 45 bildet in Zusammenwirkung mit einer entsprechenden Ablenkelektrode (nicht dargestellt) an der Kanaldecke bei Beaufschlagung mit hochfrequenten Spannungen eine gekrümmte Feldbarriere, die die anströmenden Teilchen 10a bzw. 10b in Abhängigkeit von ihren dielektrischen Eigenschaften mit verschiedenen Abständen von der Kanalseitenwand 53 passieren können. Ist die Ablenkelektrode 45 eingeschaltet, so können die kleinsten Teilchen 10a, bei denen die geringsten Polarisationskräfte induziert werden, die Feldbarriere bereits am Kanalrand passieren, während die größeren Teilchen 10b weiter hin zur Kanalmitte laufen, bis die Strömungskraft genügend groß ist, so daß eine Passage der Feldbarriere bewirkt wird. Wenn die Ablenkelektrode 45 ausgeschaltet ist, so können sowohl kleine als auch große Teilchen am Kanalrand weiter strömen.

Die Maske besitzt ein quadratisches, rahmenförmiges Segment, das dazu eingerichtet ist, das vom Teilbereich 80 des Mikrosystems ausgehende Licht zum Detektor zu übertragen. Falls nur kleine Teilchen 10a am Teilbereich 80 vorbeitreten, so ergibt sich der Signalverlauf D1 mit zwei getrennten Maxima entsprechend dem Vorbeitritt der kleinen Teilchen 10a an den zwei Rahmenseiten in Strömungsrichtung. Wenn die Ablenkelektrode 45 ausgeschaltet oder defekt ist, so werden über die Maske auch größere Teilchen detektiert, so daß sich der Signalverlauf D2 mit einem einzelnen, verbreiteten Maximum ergibt.

Die oben unter Bezug auf die Fign. 1 bis 12 beschriebenen Ausführungsbeispiele bezogen sich auf die Teilchendetektion in den an sich bekannten Mikrosystemen mit Kanalstrukturen aus in Bezug auf die Teilchen inerten Materialien. Die im folgenden erläuterten Fign. 13 bis 15 zeigen eine besonderes vorteilhafte Anwendung der Erfindung in modifizierten Mikrosystemen, in denen die Wechselwirkung der Teilchen mit den Kanalwänden nicht vermieden, sondern in vorbestimmter Weise befördert wird. Diese Modifizierung ist in den Fign. 13A und 13B in Analogie zur Darstellung gemäß Fig. 1 illustriert.

Fig. 13A zeigt in schematischer Perspektivansicht wie Fig. 1 den Ausschnitt eines fluidischen Mikrosystems. Allerdings bildet hier der Kanalboden 51 ein Substrat für eine Modifizierungsschicht 55. Die Modifizierungsschicht 55 besteht beispielsweise aus einer Monolage biologischer Zellen. Wiederum soll, wie oben beschrieben die Bewegung des Teilchens 10 mit der erfindungsgemäßen Objektdetektion erfaßt werden, die hier durch eine rahmenförmige Maske 20 erfolgt. Das Teilchen 10 ist ein Testobjekt, das eine biologische Zelle oder ein künstliches Teilchen mit spezifischen oder unspezifischen Bindungsstellen (Molekülen) sein kann. Die Bewegung des Teilchens 10 wird durch die Wechselwirkung mit der Modifizierungsschicht

55, d.h. durch die auftretenden Adhäsionserscheinungen beeinflüßt.

Zur Bestimmung der Adhäsionseigenschaften des Teilchens 10 gegenüber der Modifizierungsschicht 55, d.h. zur Bestimmung von Bindungskräften, Bindungskonstanten und/oder der Dynamik der Zelladhäsion wird das Teilchen mit Hilfe des Fanglasers 60 auf die Oberfläche der Modifizierungsschicht 55 gedrückt, während das Drehfeld der Elektrodenanordnung 40 schwingende Rotationen nach links oder rechts induziert. Die oszillatorischen Teilchenvibrationen in die Zustände 11a, 11b werden, wie oben beschrieben, über die Maske 20 erfaßt. Durch Vergleich mit den Bewegungseigenschaften ohne eine Adhäsion lassen sich Aussagen über die Bindungskräfte und dergl. treffen. Abweichend von der dargestellten Rahmenmaske 20 können auch andere Maskenformen Anwendung finden. Fig. 13B zeigt die entsprechende Situation in Draufsicht.

Die Modifizierung kann auch durch ein einzelnes Teilchen auf dem Kanalboden 51 gebildet werden. Diese Situation ist in Fig. 14 illustriert. Auf dem Kanalboden 51 befindet sich eine biologische Zelle 56. Wiederum erfolgt die erfindungsgemäße Erfassung der Teilchenbewegung des Teilchens 10 in Abhängigkeit von der Wechselwirkung mit der Zelle 56. Bei genügend kleinen Teilchen (Durchmesser kleiner 5 µm) können die Oberflächen der Zellen 56 auch ortsaufgelöst vermessen werden. Es besteht auch die Möglichkeit, die ortsaufgelöste, partielle Vermessung der Wechselwirkungen der Zelle 56 mit dem Teilchen 10 mit einer chemische Stimulierung der angehefteten Zelle 56 zu verbinden.

Fig. 15 zeigt eine weitere Abwandlung der Objektdetektion zur Erfassung von Wechselwirkungen eines Teilchens mit einer Modifizierungsschicht auf dem Kanalboden 51. Die Modifizierungsschicht besteht aus einer Vielzahl molekularer Rezeptoren 57.

Das Teilchen 10 weist Liganden 12 auf. Es erfolgt eine Drehung des Teilchens, wie dies oben unter Bezug auf Fig. 1 beschrieben wurde. Aus der Teilchendetektion kann festgestellt werden, ob der Ligand 12 eine Bindung mit den Rezeptoren 57 eingeht. Das Teilchen 10 kann selbst eine biologische Zelle oder ein Zellbestandteil sein und natürlich bedingt einen Rezeptor auf der Oberfläche tragen.

Eine weitere Anwendung der Erfindung zur Messung von Kräften in einem Mikrosystem ist in den Fign. 16 und 17 illustriert. Fig. 16 zeigt analog zu Fig. 1 einen Ausschnitt eines Mikrosystems mit dem Kanalboden 51 und den unteren Mikroelektroden 41. Mit dem Fanglaser 60 wird das Teilchen 10 an eine vorbestimmte Position P mit den Koordinaten (x_1, y_1, z_1) geführt und dort den Drehfeldern der Elektrodenanordnung ausgesetzt. Die Abbildungseinrichtung mit der Maske 20 wird entsprechend verstellt, um die Objektbewegung zu erfassen. Die am Punkt P gemessene Winkelgeschwindigkeit des Teilchens 10 steht in direkter Beziehung zur Feldstärke an diesem Ort (die Winkelgeschwindigkeit ist proportional zum Quadrat der Feldstärke). Auf diese Weise kann mit der erfindungsgemäßen Objektdetektion unter Verwendung eines kleinen Probeteilchens 10 das elektromagnetische Feld im Mikrosystem in x-, y- und z-Richtung vermessen werden, indem das Probeteilchen 10 rasterartig an verschiedenen Raumpositionen zwischen den Mikroelektroden einer Rotationsmessung unterzogen wird.

Bei dieser Messung kann auch eine Maskengestaltung vorgesehen sein, mit der Teilchenbewegungen im gesamten Bereich zwischen den Mikroelektroden erfaßt werden können. In diesem Fall muß die Maske 20 bei der Verstellung zu einem neuen Punkt P nicht verschoben werden.

Eine weitere Maskengestaltung mit zwei streifenförmigen Segmenten (Detektionsschlitze) wird gemäß Fig. 17 zur Erfassung

von Teilchenbewegungen in Pfeilrichtung verwendet. Die Bewegung des Teilchens 10 in x-Richtung erfolgt mit dem (nicht dargestellten) Fanglaser oder durch eine Verschiebung der Amplituden der hochfrequenten Spannungen an den Elektroden 41a, 41b bzw. 41c, 41d. Aus der Auslenkung des Teilchens lassen sich Informationen über dielektrische Teilcheneigenschaften, die Feldkräfte im Fokus des Fanglasers und die elektromagnetischen Feldkräfte ableiten.

Analog zu der in den Fig. 15 bis 17 erläuterten Technik kann auch eine Vermessung der Feldkräfte im Fanglaser 60 durch Messung der Drehgeschwindigkeit eines Probeteilchens in Abhängigkeit vom Abstand vom Fokus des Fanglasers verwendet werden.

Die erfindungsgemäße Objektdetektion ist auch zur Erfassung von Teilchendeformationen einsetzbar. Dies ist in Fig. 18 illustriert. Das Teilchen 10 wird durch Einstellung eines inhomogenen hochfrequenten elektrischen Feldes an den Elektroden 41a, 41b bzw. 41c, 41d deformiert, während es mit dem Fanglaser in freier Suspension gehalten wird. Die Deformation kann beispielsweise von einer runden Teilchengestalt (oberer Teil von Fig. 18) zu einer ellipsenförmigen Teilchengestalt (unterer Teil von Fig. 18) führen. Mit einer Schlitzmaske, die zwei streifenförmige Segmente aufweist, die dazu eingerichtet sind, Licht von den Teilbereichen 80a, 80b des Mikrosystems zum Detektor zu übertragen, kann die Asymmetrie des Teilchens 10 erfaßt werden. Aus der Verformung, die aus dem Detektorsignal abgeleitet wird, können mechanische Eigenschaften des Teilchens (z.B. biologische Zelle) abgeleitet werden. Anwendungsabhängig können zur Deformationsuntersuchung auch andere Maskenformen verwendet werden, die an die jeweiligen Asymmetrien angepaßt sind.

Fig. 19 ist eine Übersichtsdarstellung einer erfindungsgemäßen Einrichtung zur Objektdetektion bei Implementierung der Erfin-

dung an einem fluidischen Mikrosystem. Das fluidische Mikrosystem 110, in dem eine Suspension mit mindestens einem zu untersuchenden Teilchen enthalten ist, wird über eine Steuereinrichtung 111 angesteuert. Enthält das Mikrosystem Mikroelektroden zur dielektrischen Teilchenmanipulierung, so enthält die Steuereinrichtung 111 insbesondere einen Generator zur Elektrodenansteuerung.

Ein interessierender Bereich des Mikrosystems 110 wird über optische Elemente 121 vergrößert auf der strukturierten Maske 120 abgebildet, die mit einer Stelleinrichtung 122 in Bezug auf das Mikrosystem einstellbar ist. Das durch die strukturierte Maske 120 hindurchtretende Licht wird durch weitere optische Elemente 121, die gegebenenfalls einen Sperrfilter in Bezug auf das Licht des Fanglasers 160 umfassen, auf den Detektor 123 (z.B. Photodiode) summierend abgebildet. Der Detektor 123 ist mit einer Auswertungseinrichtung 124 verbunden, die insbesondere eine Recheneinheit zur Auswertung der Signalverläufe und eine Anzeigeeinheit zur visuellen Darstellung der erfaßten Objekteigenschaften enthält. Die Auswertung der Signalverläufe erfolgt in an sich bekannter Weise, insbesondere in Bezug auf die zeitliche Lage der Maxima, die Amplituden der Signale und deren Phasenlagen.

Fig. 19 zeigt ferner den Fanglaser 160, der über eine gesonderte Laser-Tweezer-Steuerung 161 angesteuert wird. Das Zeichen 200 zeigt eine Gesamtstreuereinheit zur anwendungsabhängigen synchronen Betätigung der Lasersteuerung 161, der Steuereinrichtung 111 und der Stelleinrichtung 122.

Die Abbildungseinrichtung mit den optischen Elementen und der strukturierten Maske 120 wird vorzugsweise in ein Mikroskop integriert, dessen Einzelheiten nicht dargestellt sind. Über das Mikroskop kann ebenfalls der Fanglaser 160 in das Mikrosystem 110 gerichtet werden.

Bei einer alternativen Gestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird die strukturierte Maske unmittelbar auf der lichtempfindlichen Fläche des Detektors ausgebildet. Es kann ferner vorgesehen sein, daß der Detektor nicht durch eine einzelne Photodiode, sondern durch eine CCD-Matrix gebildet wird. Bei einer derartigen Gestaltung kann eine Abbildung des Aufenthaltsbereichs des Teilchens auf die CCD-Matrix und eine anschließende elektronische Maskierung des Matrixsignals durch Auswertung der Signale von bestimmten Bildpunkten erfolgen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Objektdetektion mit den Schritten:

- vergrößerte optische Abbildung mindestens eines ruhenden oder bewegten Objekts (10) auf eine strukturierte Maske (20) mit mindestens einem Segment (30), das dazu eingerichtet ist, Licht von einem flächigen Teilbereich (80), in dem sich das Objekt (10) zumindest teil- oder zeitweise befindet und der eine charakteristische Dimension besitzt, die kleiner als die Dimension des Objekts (10) oder seiner Bewegungsbahn ist, zu einer Detektoreinrichtung (123) zu übertragen,
- Detektion der von der strukturierten Maske (20) übertragenen Lichtmenge und Erzeugung eines Detektorsignals, das in einem vorbestimmten Zusammenhang mit der Lichtmenge steht, und
- Auswertung des Detektorsignals in Bezug auf das Vorhandensein des Objekts (10), seine Position, seine Form und/oder die zeitliche Änderung der Position.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Objektdetektion an synthetischen oder biologischen Teilchen (10) in einem Mikrokanal eines fluidischen Mikrosystems durchgeführt wird, in dem das Teilchen hydrodynamischen, akustischen, magnetischen und/oder elektrischen Kräften ausgesetzt ist.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem die Maske (20) in Bezug auf das Mikrosystem so positioniert ist, daß von der Maske Licht von einem Teilbereich (80) übertragen wird, in dem das Teilchen (10) positioniert oder bewegt werden soll.

4. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem die Maske (20) in Bezug auf das Mikrosystem so positioniert ist, daß von der Maske Licht von einem Teilbereich (80) übertragen wird, in den das Teilchen (10) nicht eintreten soll.

5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem

- zur Erfassung des Vorhandenseins eines ruhenden Teilchens (10) erfaßt wird, ob das Detektorsignal (D1) eine vorbestimmte, unveränderliche Amplitude besitzt,
- zur Erfassung des Vorhandenseins eines bewegten Teilchens (10) an einer bestimmten Position ermittelt wird, ob das Detektorsignal einen vorbestimmten Zeitverlauf besitzt,
- zur Erfassung der Frequenz und Geschwindigkeit von Teilchen (10) Maxima des Detektorsignals in Bezug auf ihre Breite und ihren Abstand ausgewertet werden, und/oder
- zur Zählung von Teilchen (10) die Maxima des Detektorsignals gezählt werden.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, bei dem eine Richtungsbestimmung der Teilchenbewegung und/oder eine großenabhängige Teilchenzählung erfolgt.

7. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Amplitude des Detektorsignals und/oder die Variabilität des Detektorsignals ausgewertet werden.

8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 2 bis 7, bei dem das Teilchen (10) mit einem Fanglaser gehalten oder bewegt wird.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, bei dem das Teilchen (10) mit dem Fanglaser (60) mit einer Modifizierungsschicht (55), einer Zelle (56) oder Rezeptoren (57) im Mikrosystem in Berührung gebracht wird und bei der Auswertung des Detektorsignals in Bezug auf die Bewegungseigenschaften des Teilchens (10) Para-

meter ermittelt werden, die für die Wechselwirkung des Teilchens (10) mit der Modifizierungsschicht (55), der Zelle (56) oder den Rezeptoren (57) charakteristisch sind.

10. Vorrichtung zur Objektdetektion, die umfaßt:

- eine optische Abbildungseinrichtung zur vergrößerten Abbildung mindestens eines ruhenden oder bewegten Objekts (10) auf eine strukturierte Maske (20), die mindestens ein Licht übertragendes Segment (30) besitzt, das dazu eingerichtet ist, Licht von einem flächigen Teilbereich (80), in dem sich das Objekt (10) zumindest teil- oder zeitweise befindet und der eine charakteristische Dimension besitzt, die kleiner als die Dimension des Objekts (10) oder seiner Bewegungsbahn ist, zu einer Detektoreinrichtung (123) zu übertragen,
- eine Detektoreinrichtung (123) zur Erfassung der von der strukturierten Maske (20) übertragenen Lichtmenge und zur Bildung eines Detektorsignals, das in einem vorbestimmten Zusammenhang mit der Lichtmenge steht, und
- eine Auswertungseinrichtung zur Auswertung des Detektorsignals in Bezug auf das Vorhandensein eines Objekts (10), seine Position, seine Form und/oder die zeitliche Änderung der Position.

11. Vorrichtung gemäß Anspruch 10, bei der die optische Abbildungseinrichtung Teil eines Mikroskops ist.

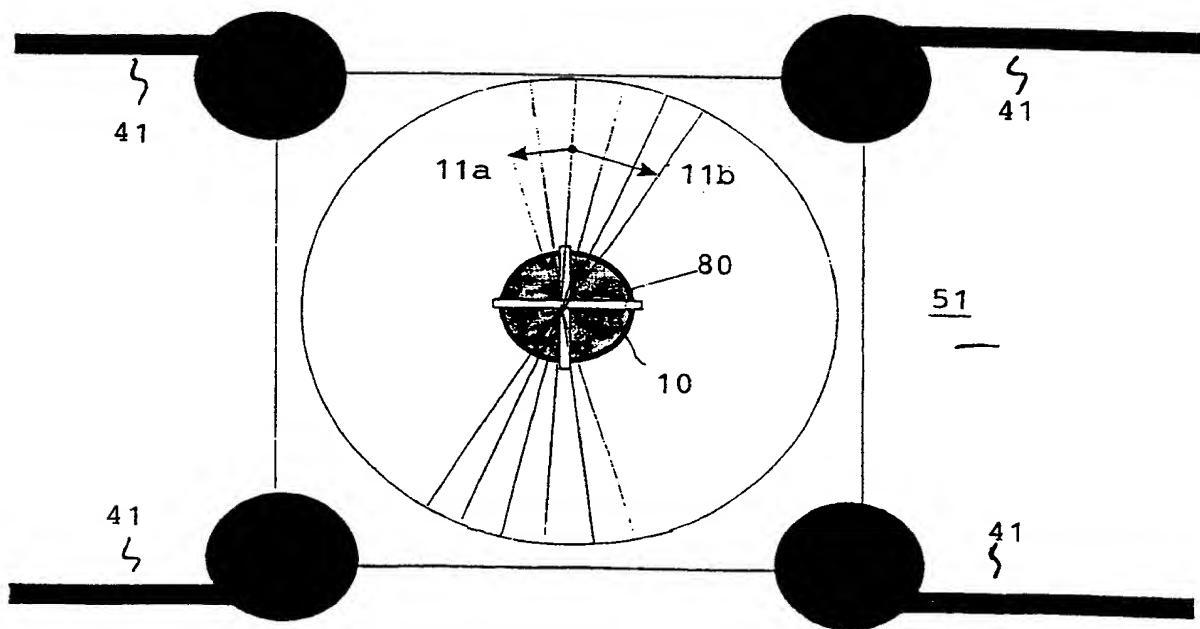
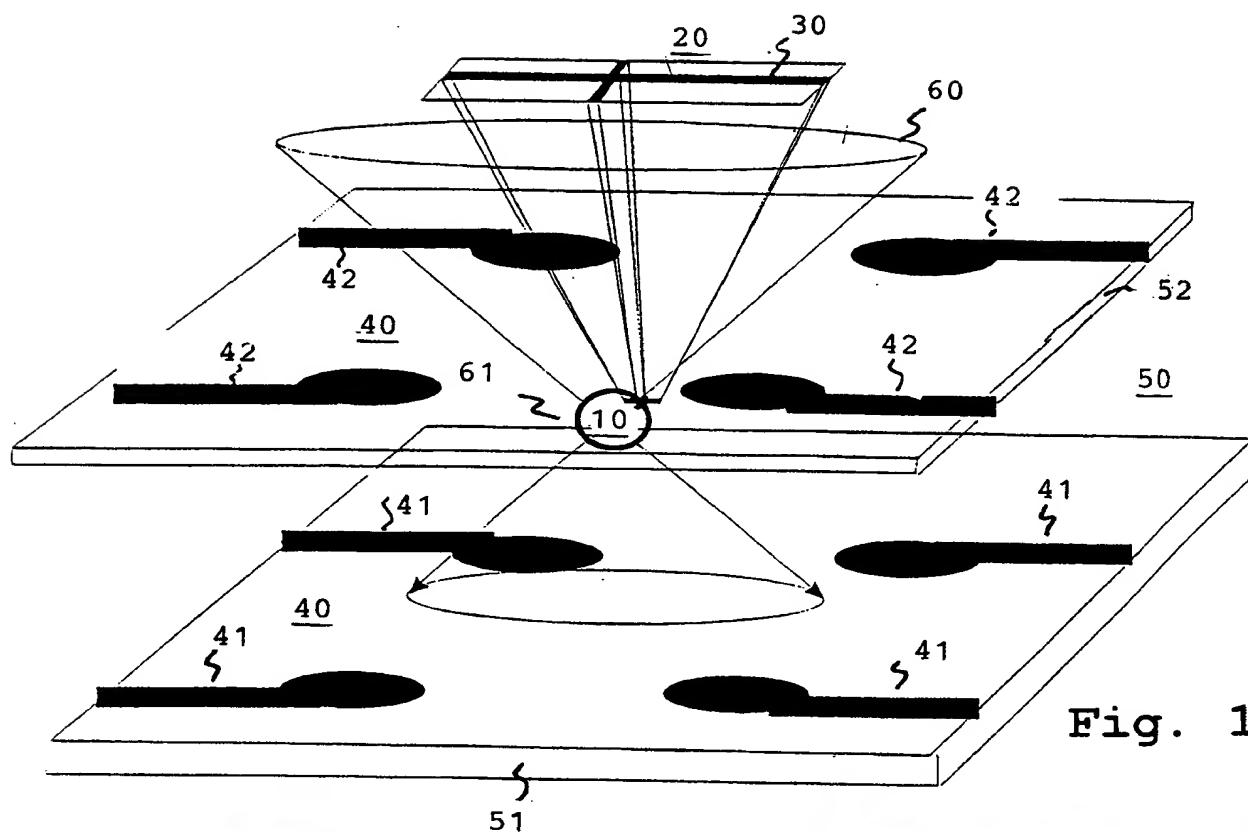
12. Vorrichtung gemäß Anspruch 11, bei dem die Maske (20) im Strahlengang des Mikroskops angeordnet ist.

13. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12, bei der die Maske (20) eine Transmissionsblende mit mindestens einem transparenten Segment (30) ist.

14. Vorrichtung gemäß Anspruch 13, bei der mehrere Segmente vorgesehen sind, die in der Maskenebene zweidimensional angeordnet sind.
15. Vorrichtung gemäß Anspruch 13 oder 14, bei der kreuzförmige Segmente, rahmenförmige Segmente und/oder gerade oder gekrümmte, streifenförmige Segmente vorgesehen sind.
16. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 10 bis 15, bei der die Detektoreinrichtung (123) zur summarischen Detektion der von der Maske (20) transmittierten oder reflektierten Teilabbildung des Objekts (10) oder seiner Bewegungsbahn eingerichtet ist.
17. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 10 bis 16, die zur Objektdetektion an synthetischen oder natürlichen Teilchen (10) in einem fluidischen Mikrosystem eingerichtet ist.
18. Vorrichtung gemäß Anspruch 17, bei dem die Teilchen (10) im Mikrosystem hydrodynamischen akustischen, magnetischen und/oder elektrischen Kräften ausgesetzt sind.
19. Vorrichtung gemäß Anspruch 17 oder 18, bei dem eine Fanglaser-Anordnung (60, 160) zur Manipulierung der Teilchen (10) im Mikrosystem vorgesehen ist.
20. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 10 bis 19, bei dem das Segment (30) eine charakteristische Dimension besitzt, die kleiner als das Objekt (10) oder seine Bewegungsbahn oder kleiner als die Abbildung des Objekts (10) oder seiner Bewegungsbahn ist.
21. Verwendung eines Verfahrens oder einer Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche zur

- dielektrischen Einzelteilchenspektroskopie in fluidischen Mikrosystemen,
- Messung elektromagnetischer Kräfte in Mikroelektrodenanordnungen,
- Messung optischer Kräfte in Fanglasern,
- Erfassung der Funktion von Mikroelektroden in Mikrosystemen,
- Erfassung von Teilchenpositionen und/oder -bewegungen, Teilchenzahlen und/oder Teilchenwechselwirkungen, und/oder
- Messung von Teilchenrotationen, die durch rotierende elektrische Felder induziert sind.





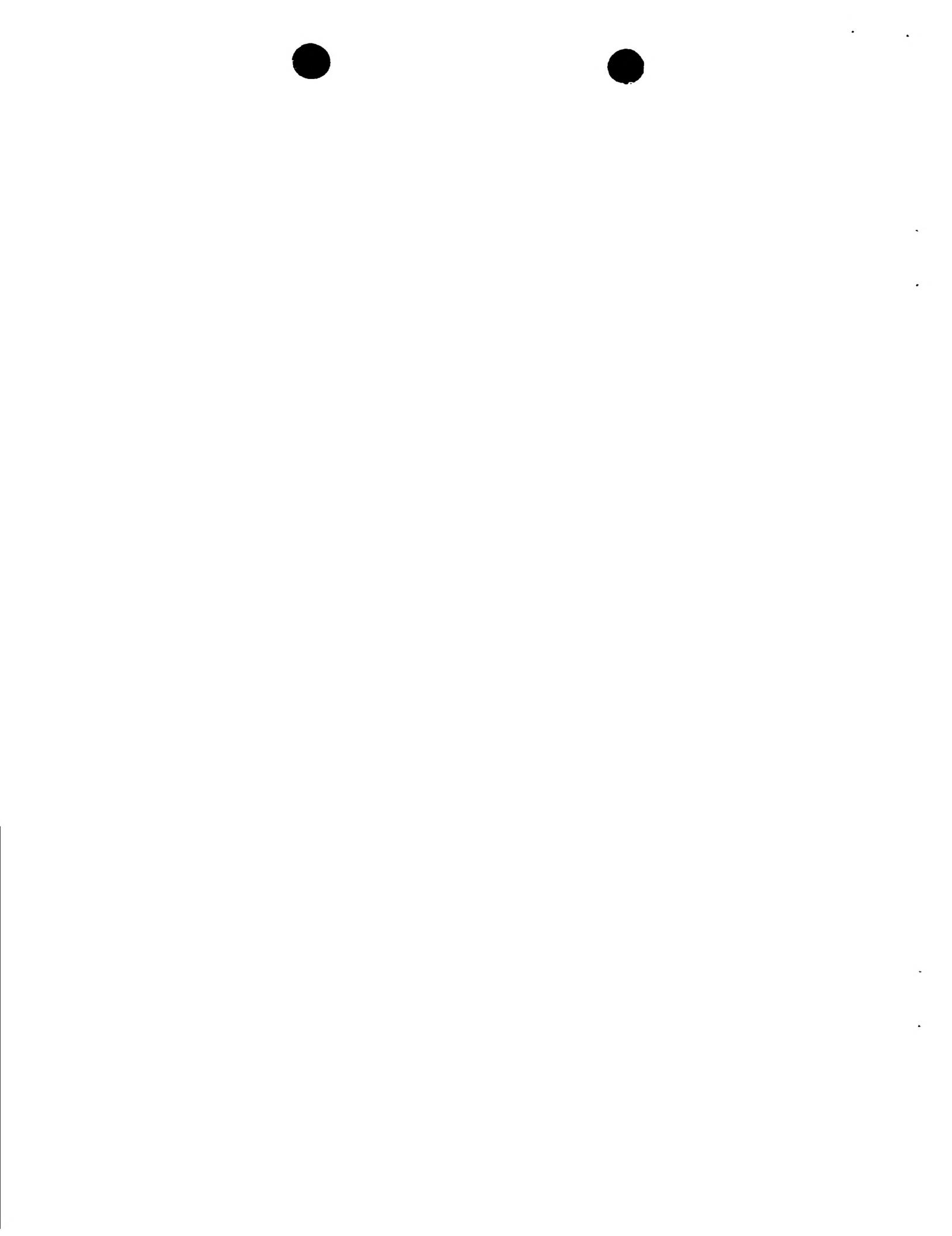


Fig. 2

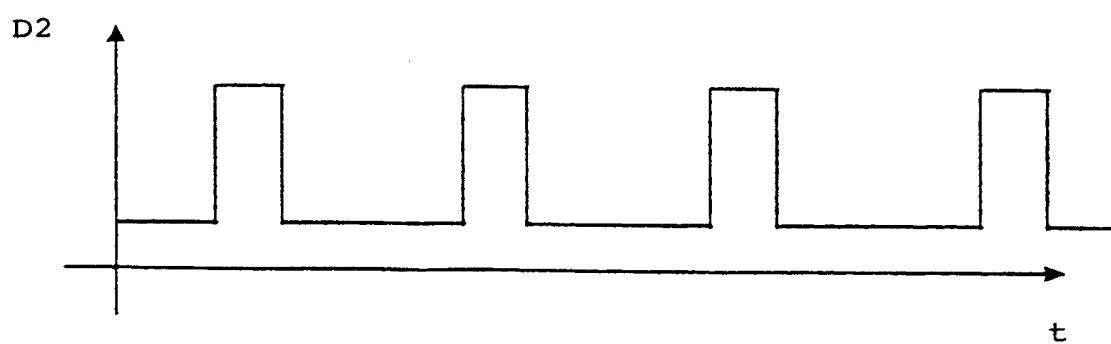
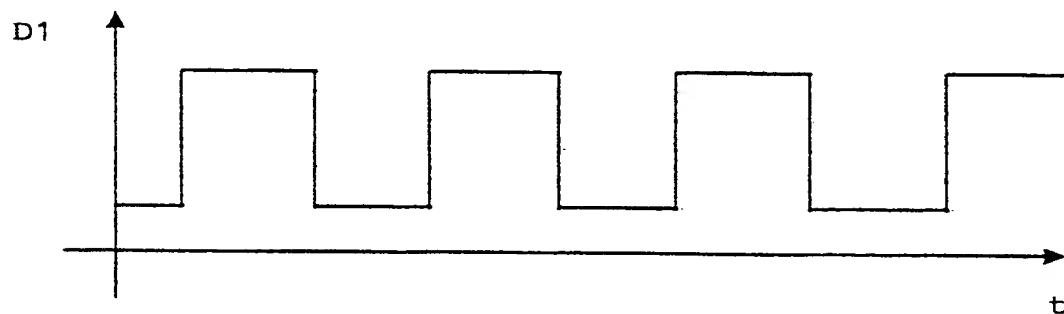
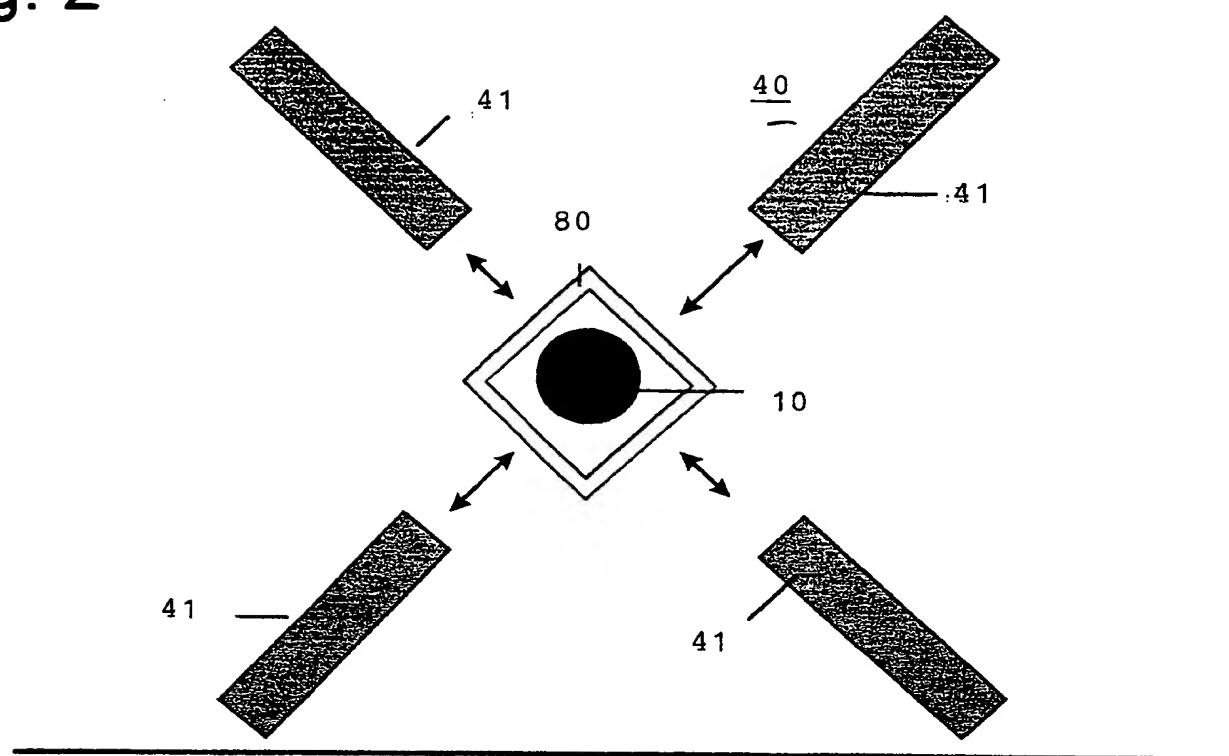




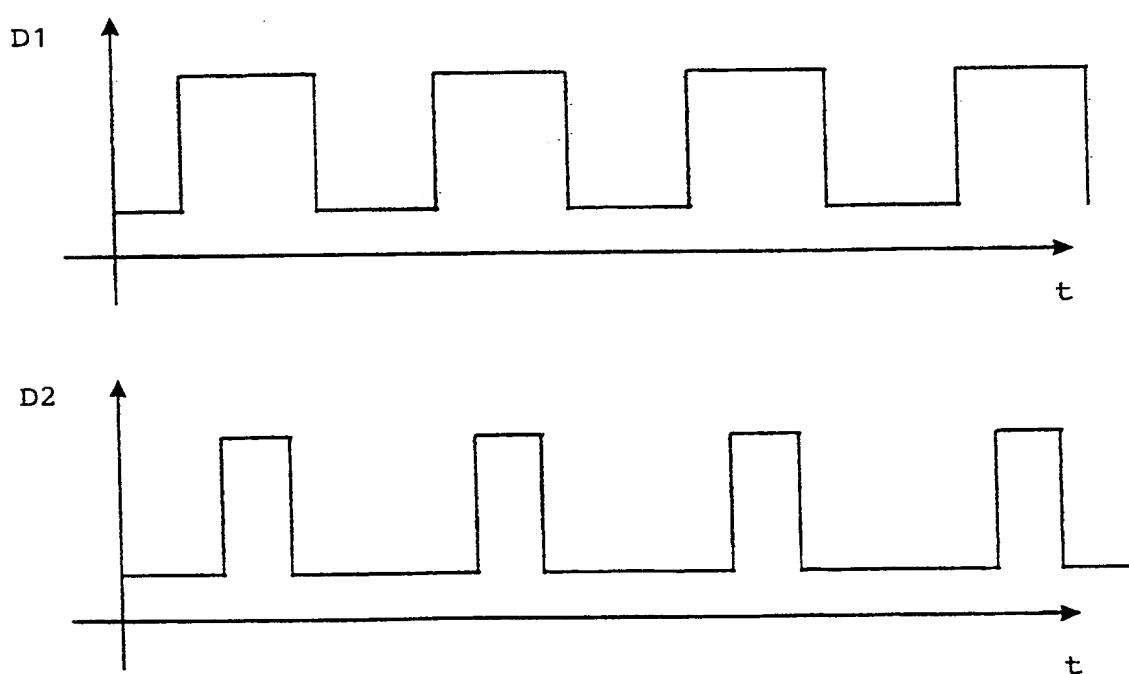
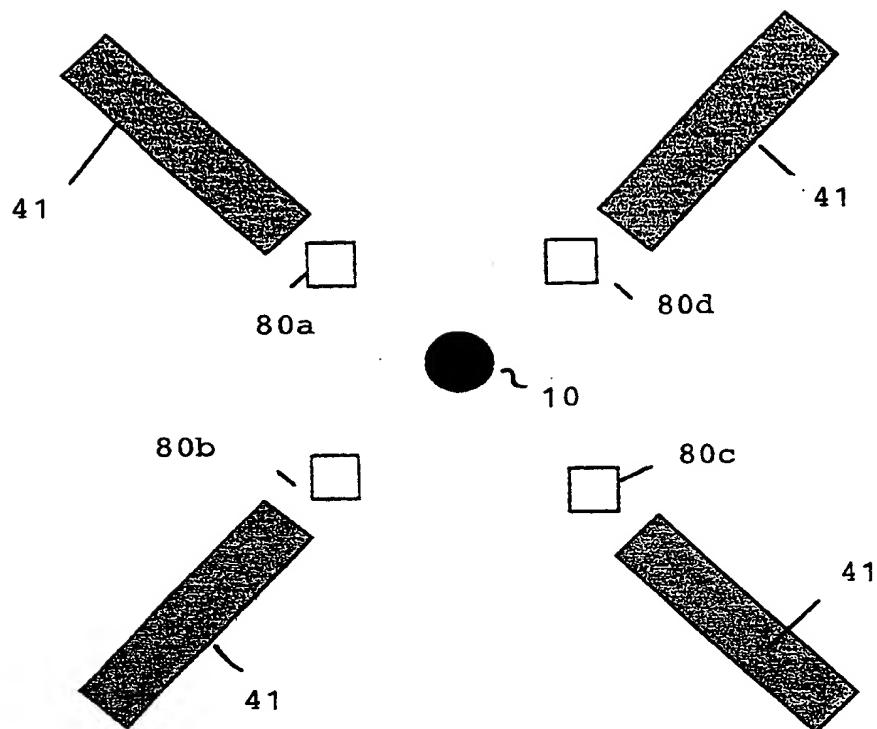
Fig. 3



Fig. 4

4/18

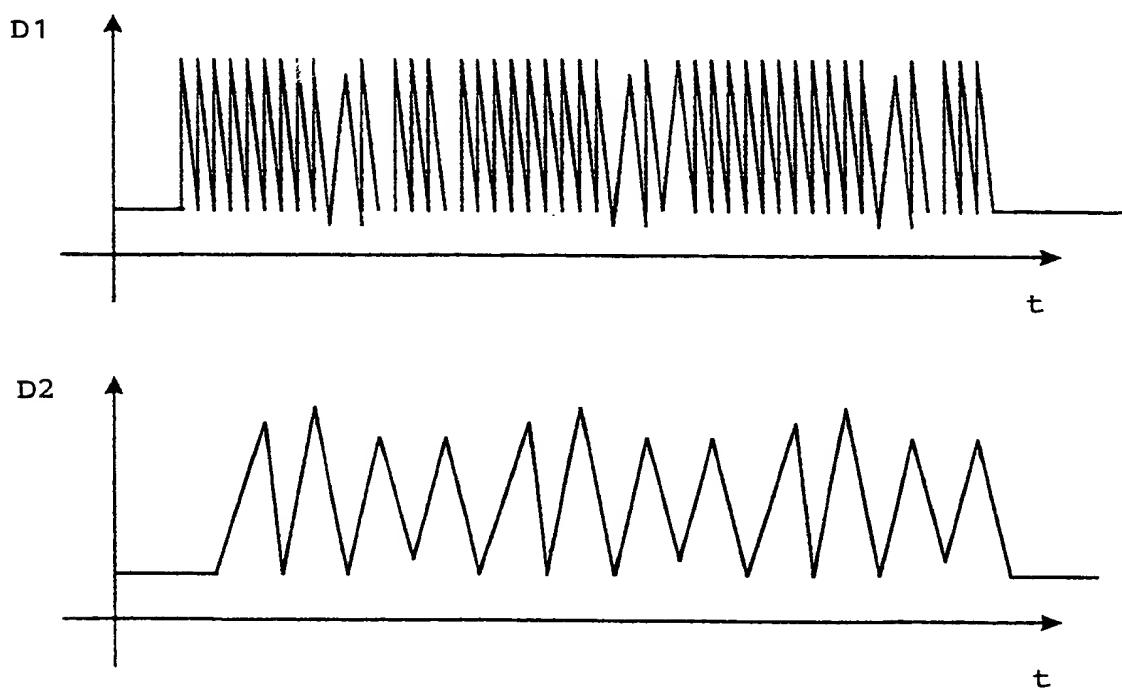
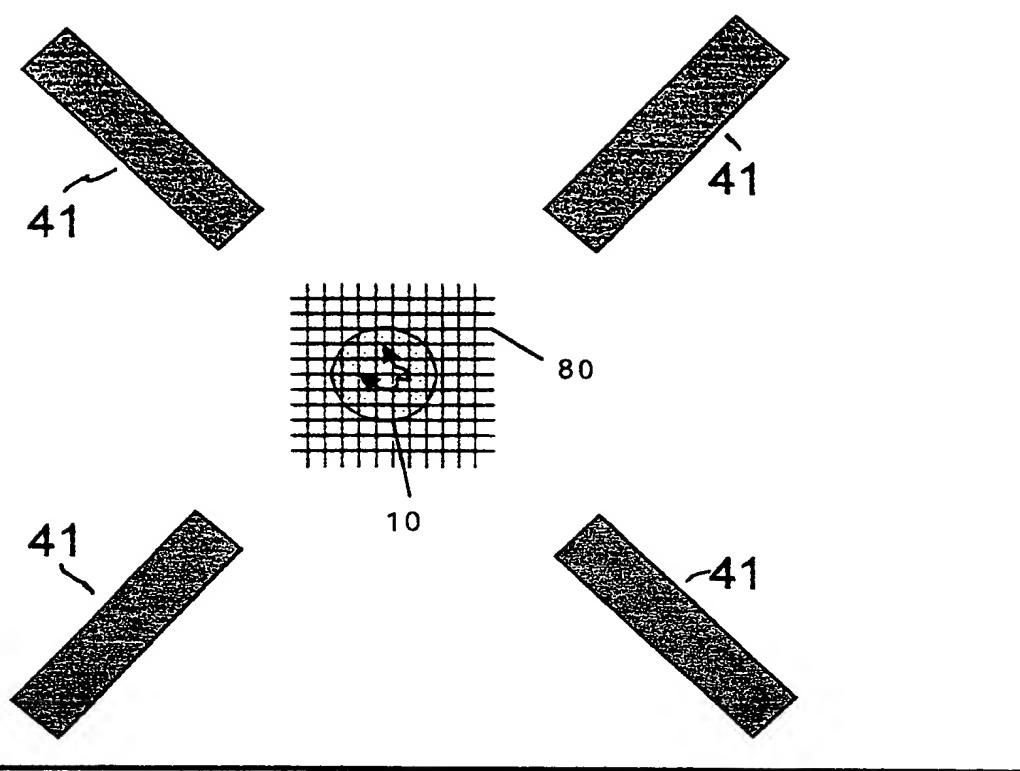




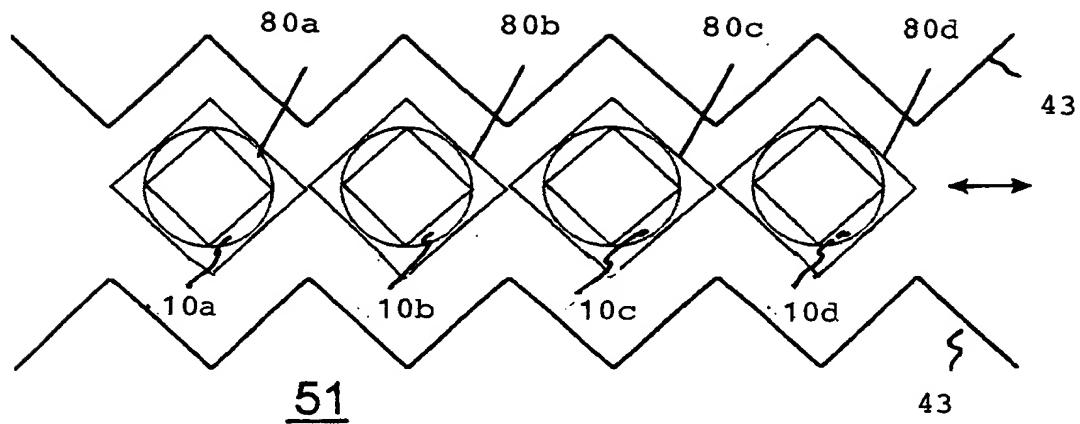
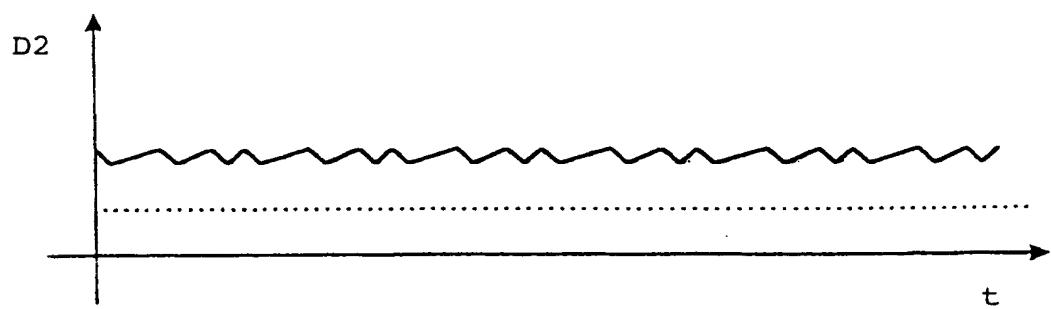
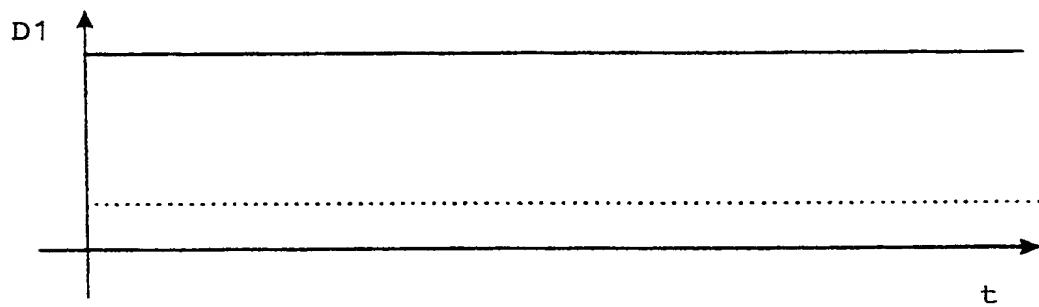
Fig. 551



Fig. 6

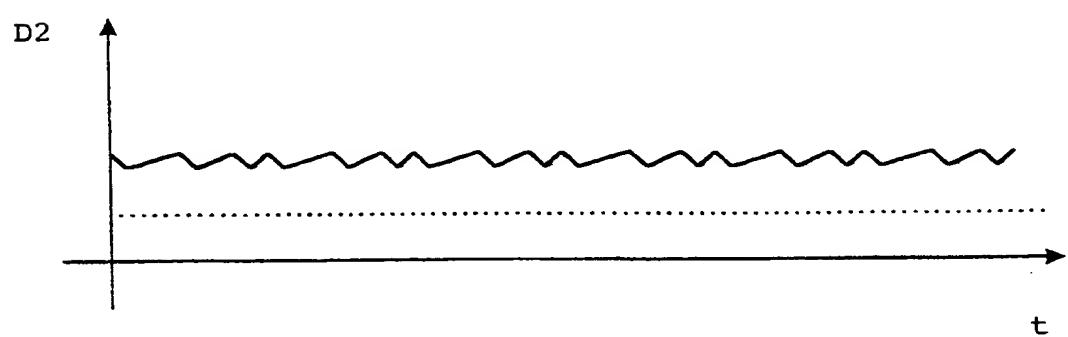
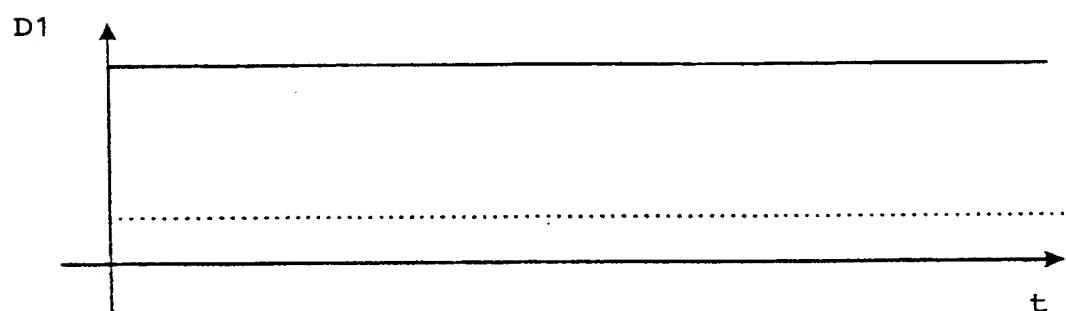
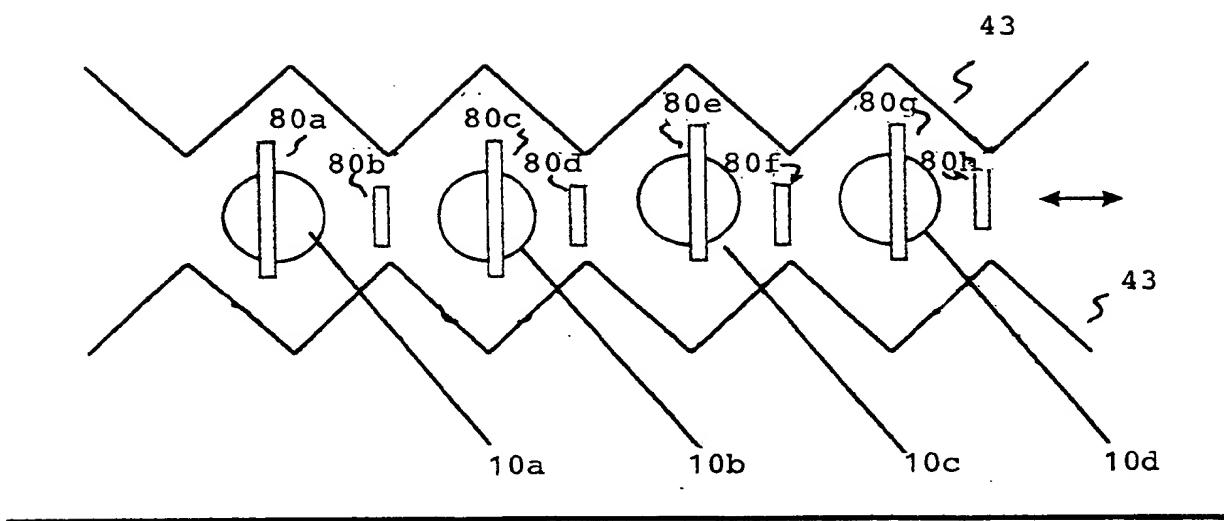
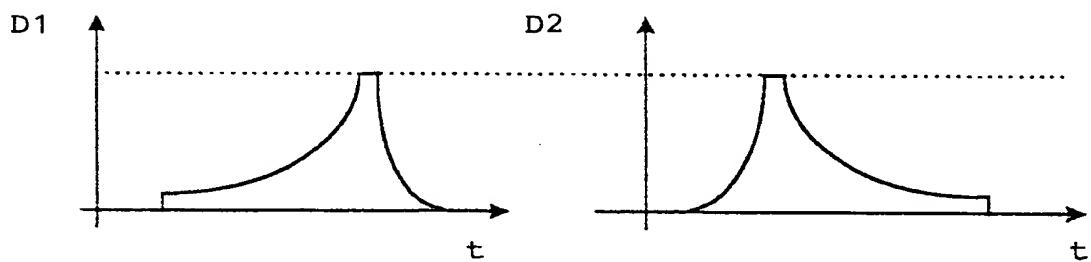
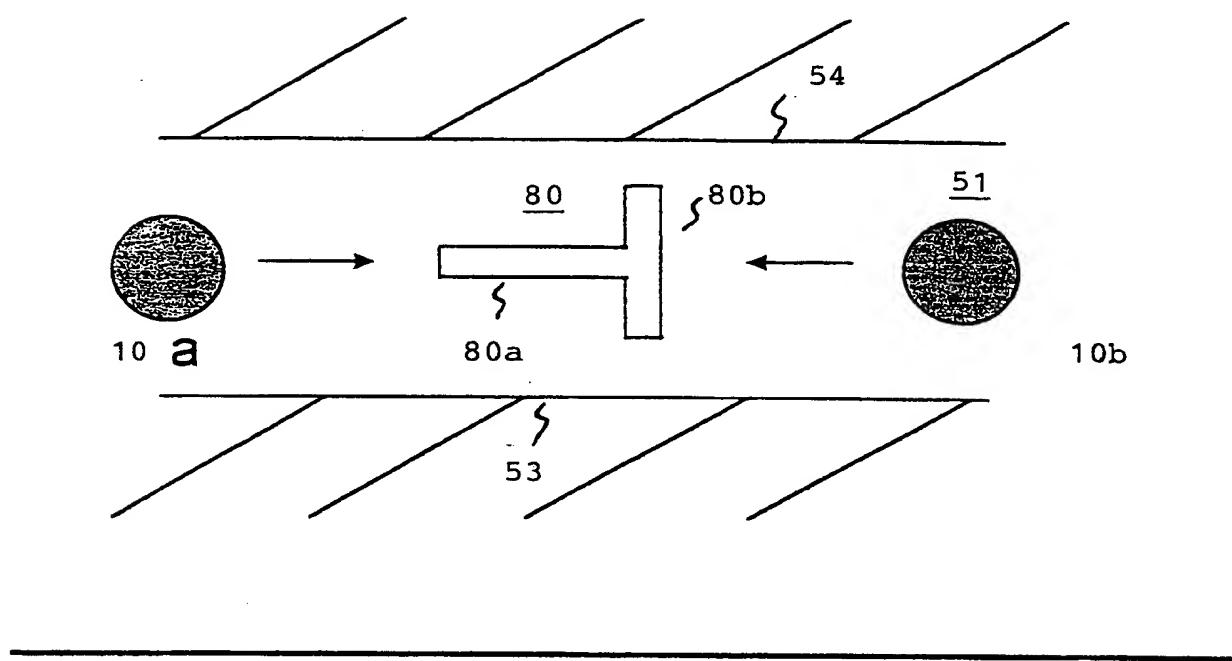




Fig. 7

7/18





8 / 18

Fig. 8

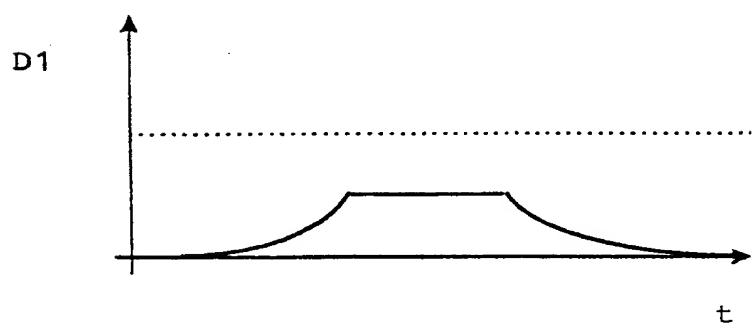
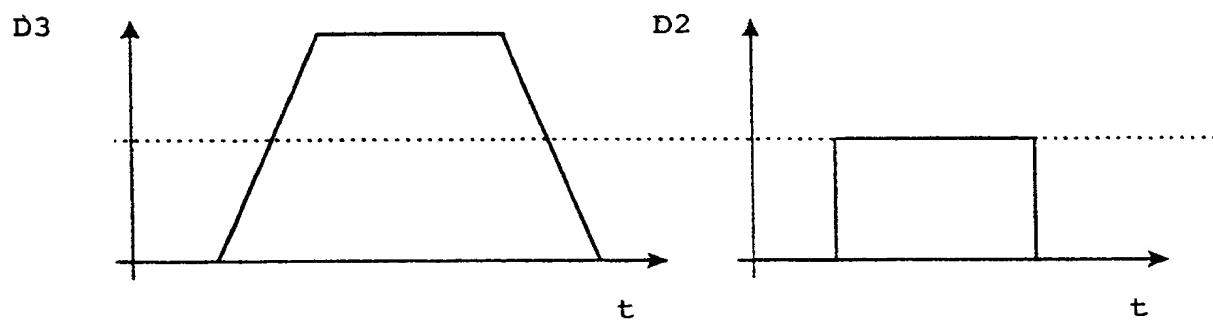
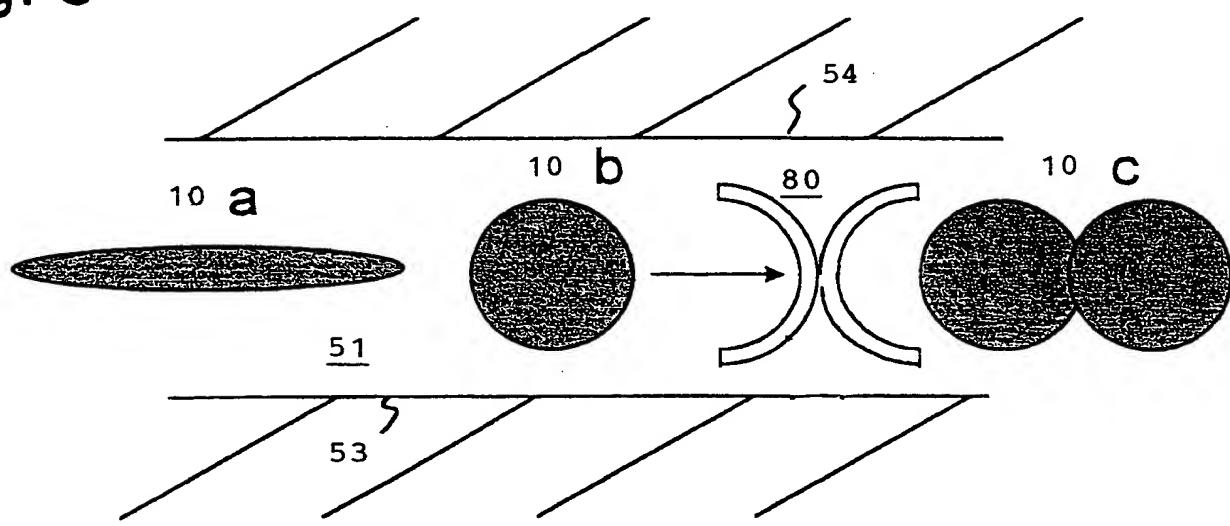
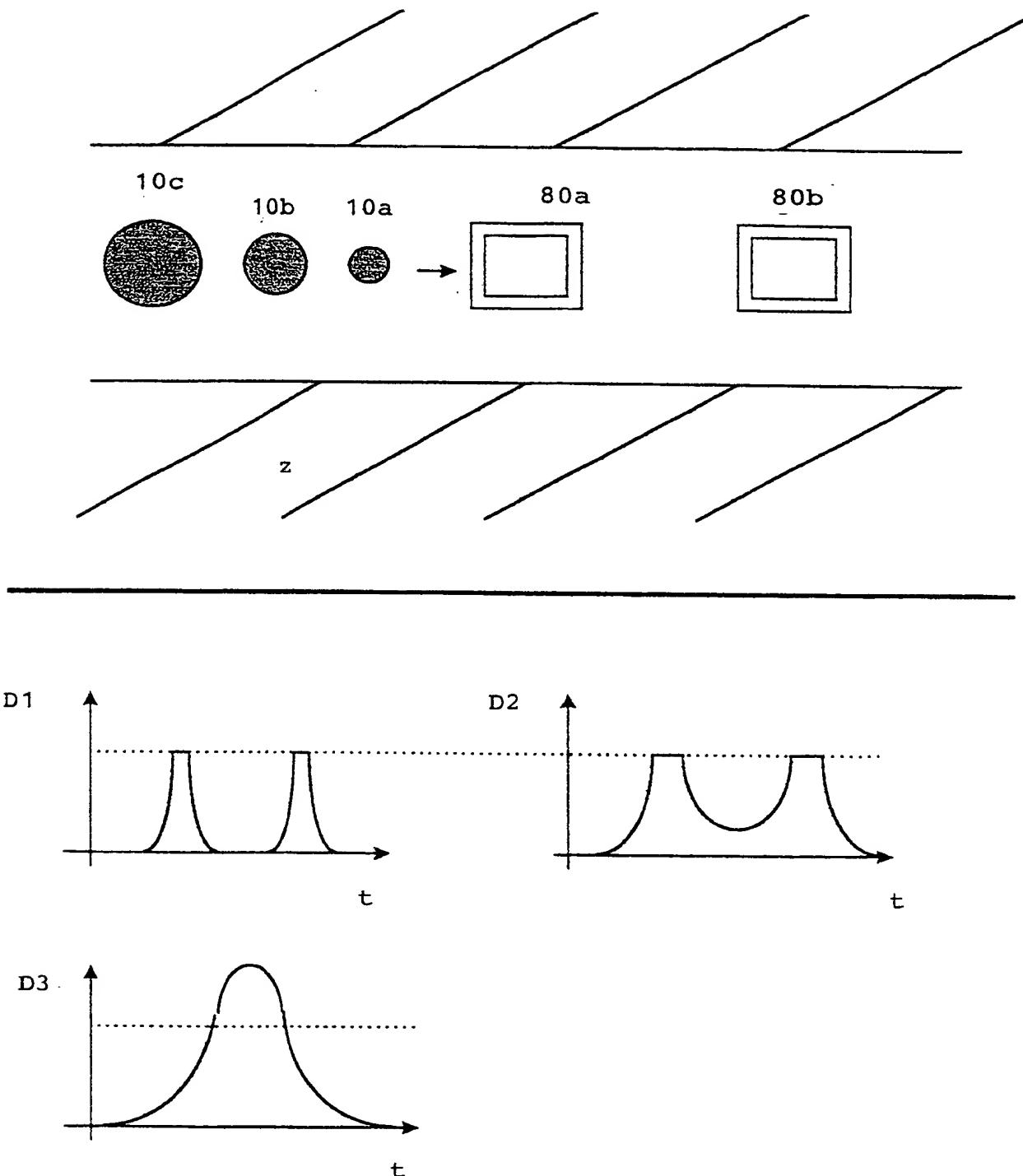




Fig. 9

9/18



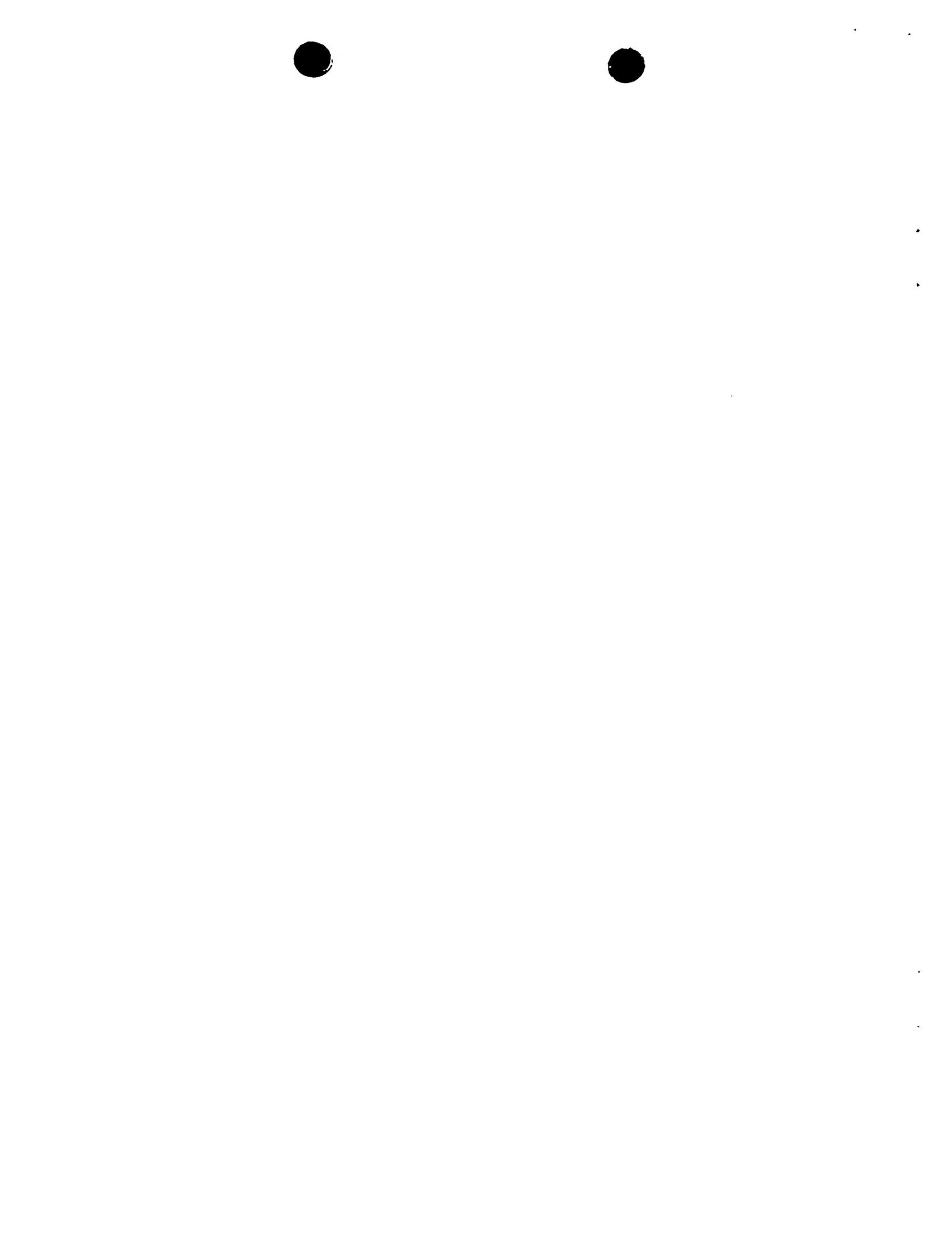


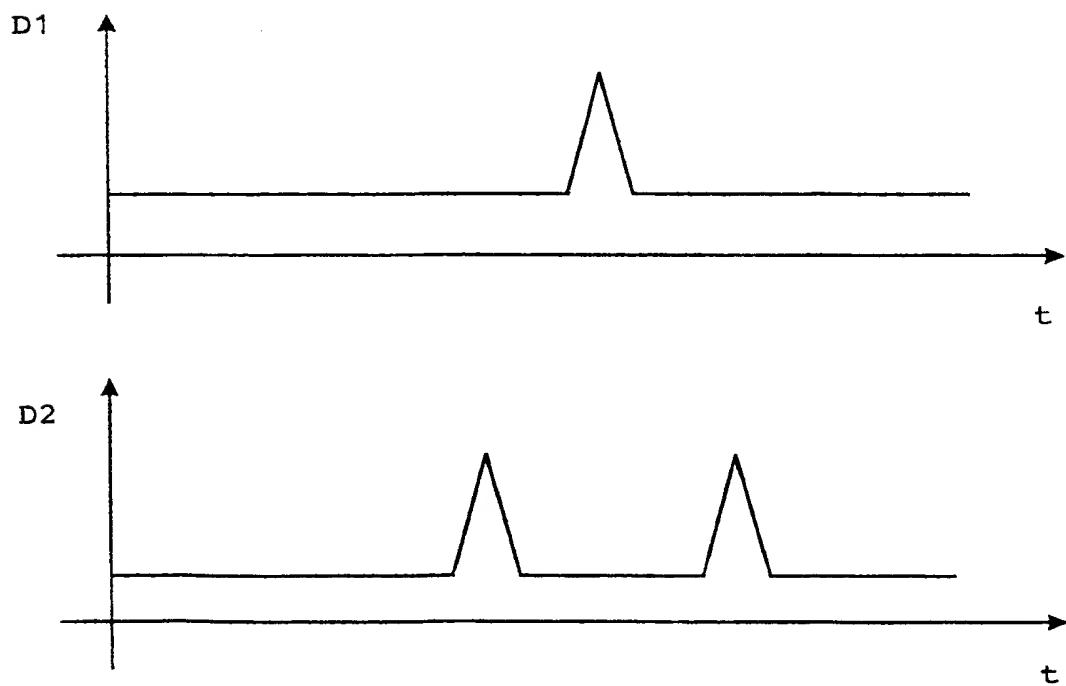
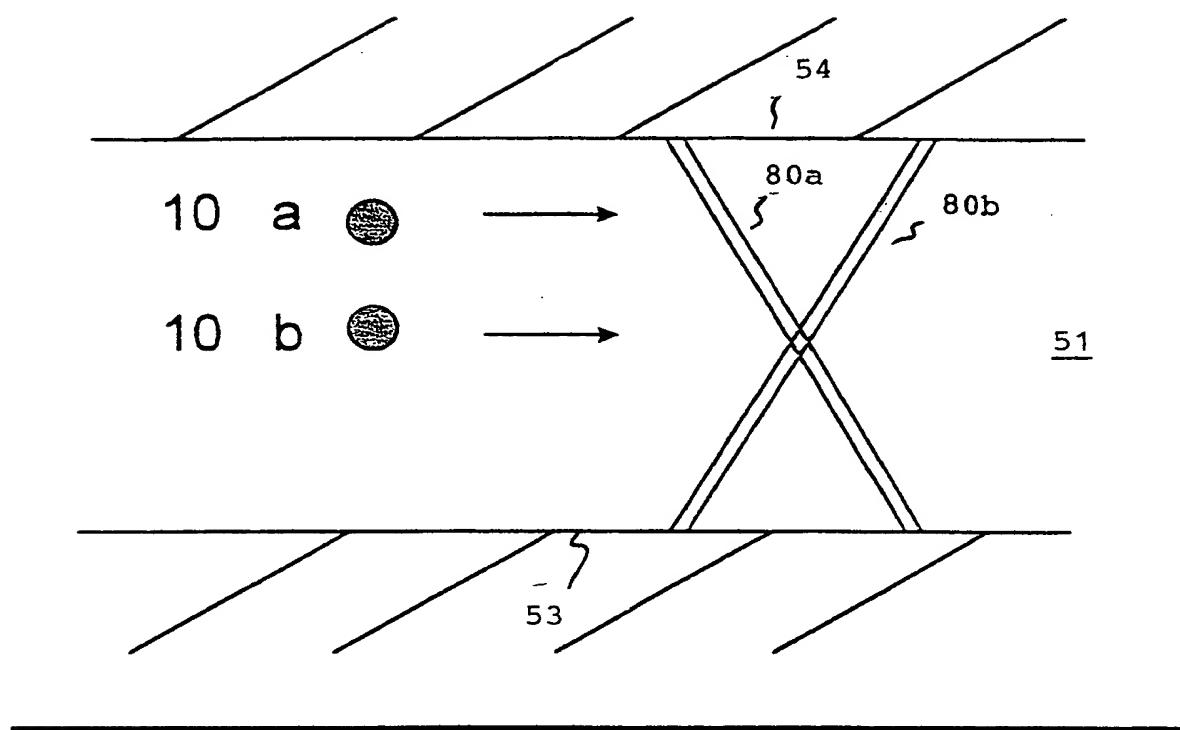
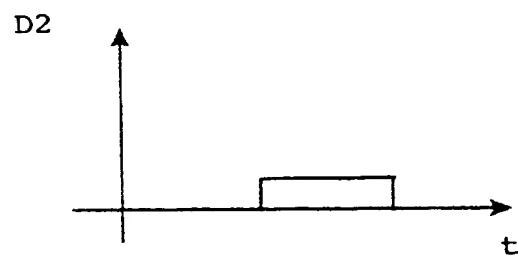
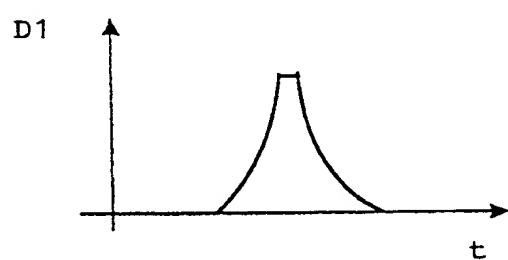
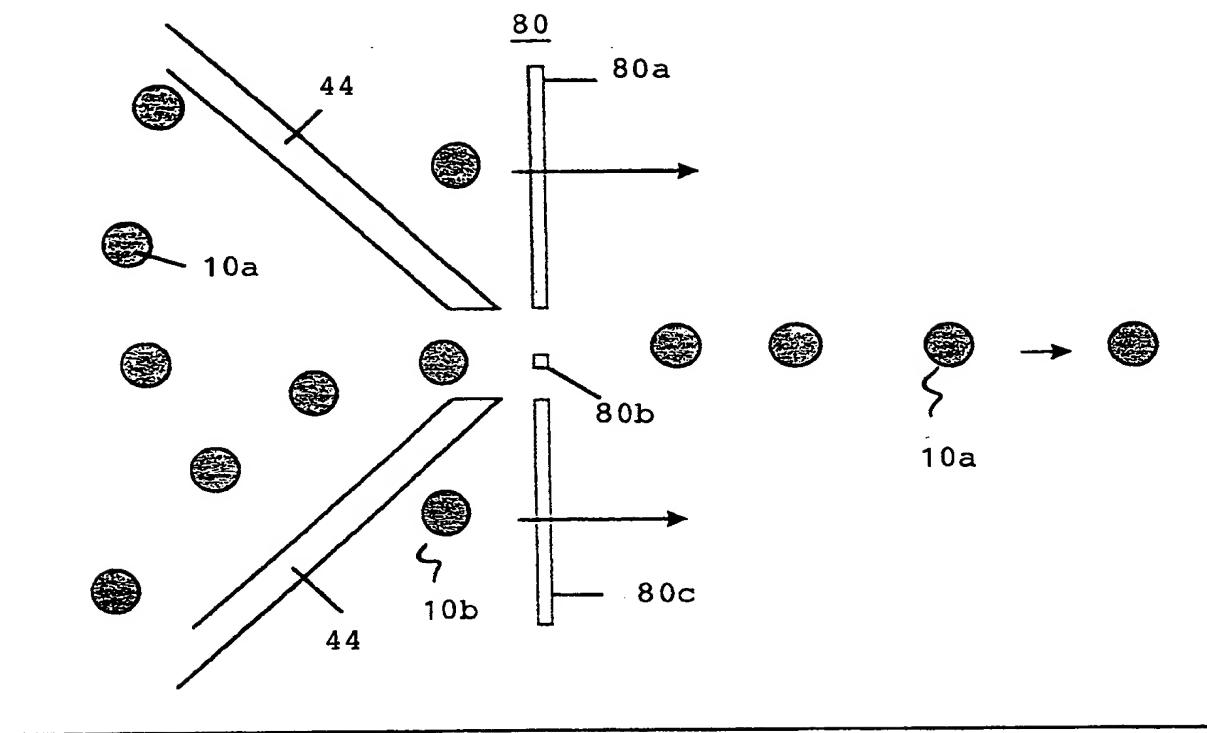
Fig. 10



Fig. 11

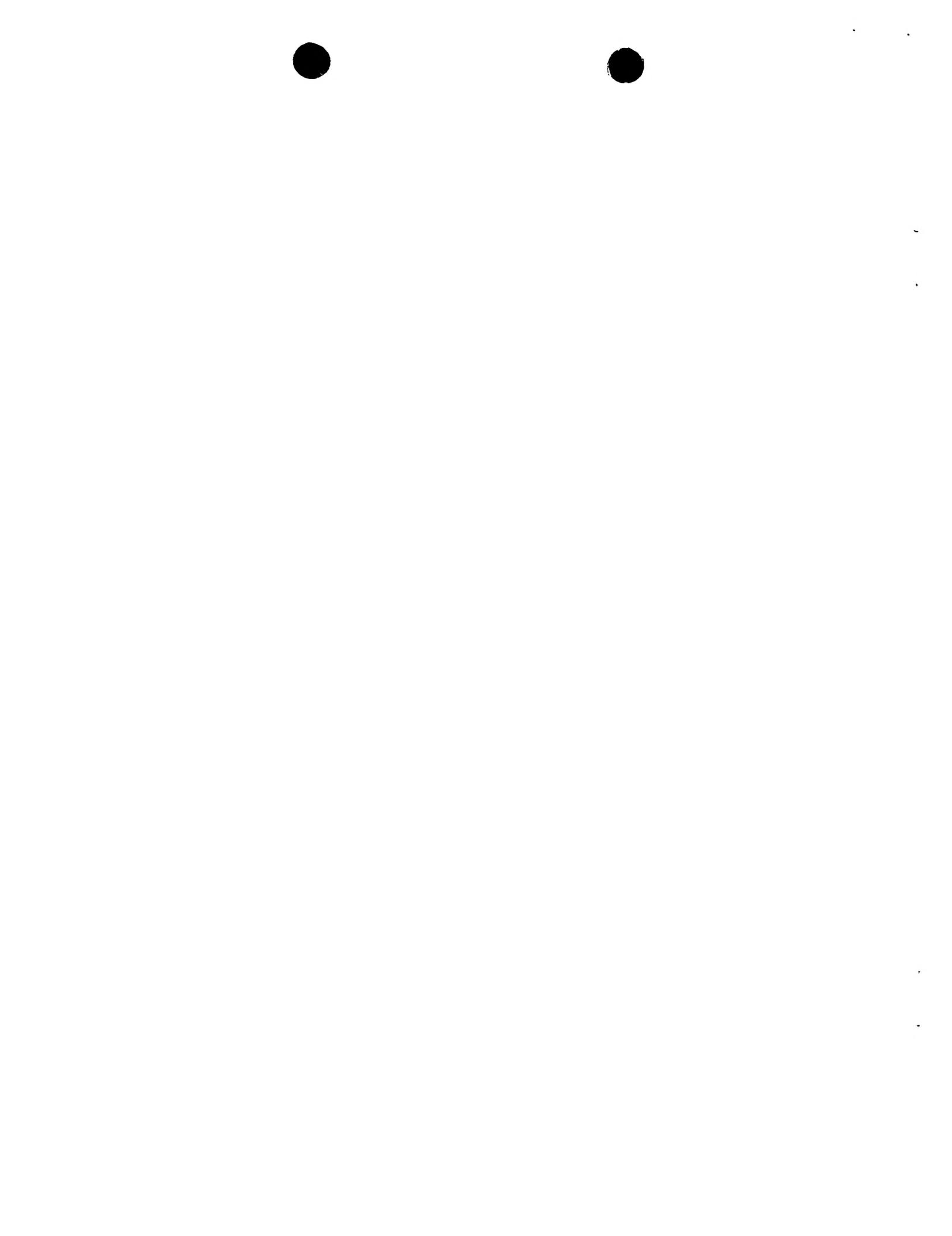
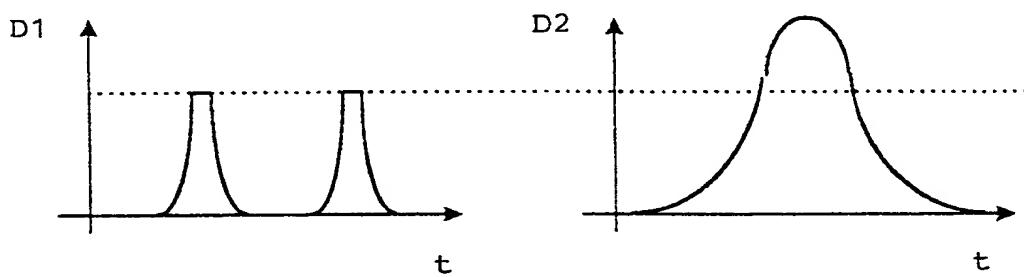
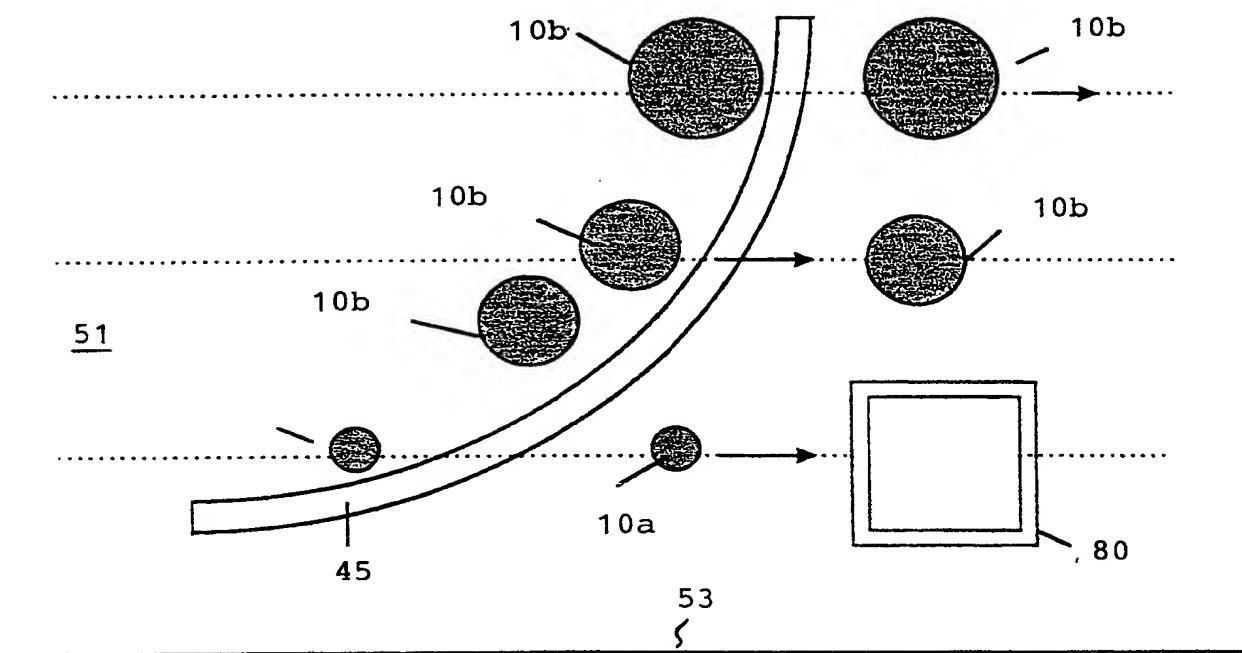
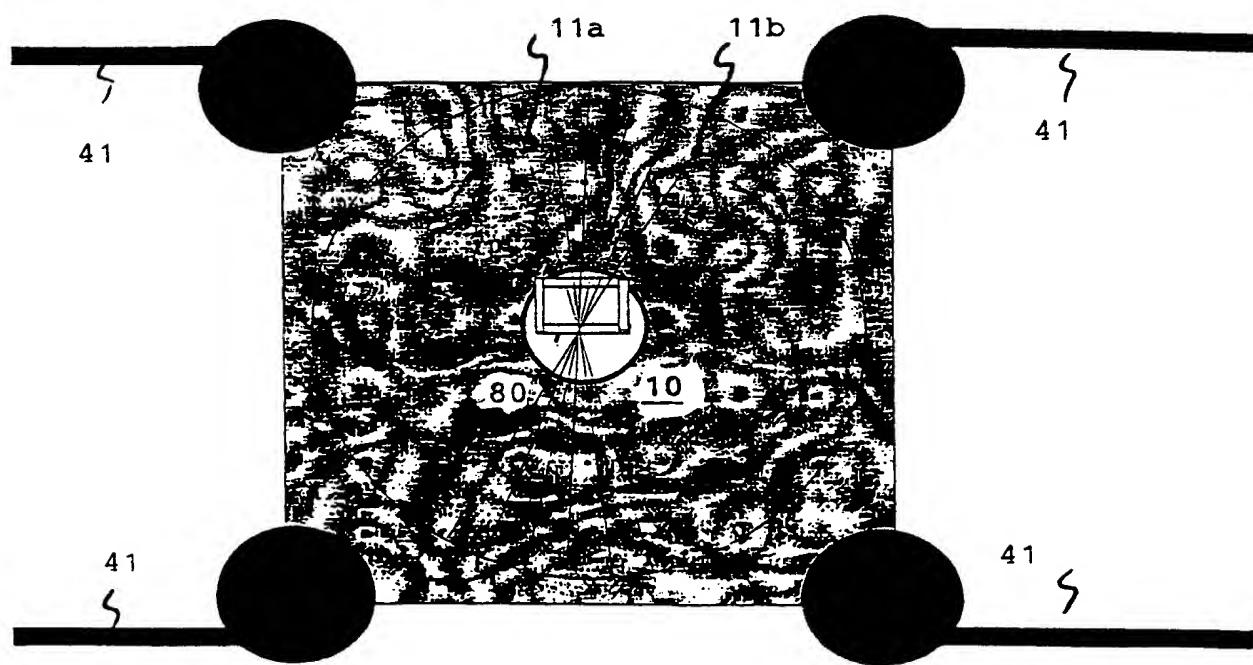
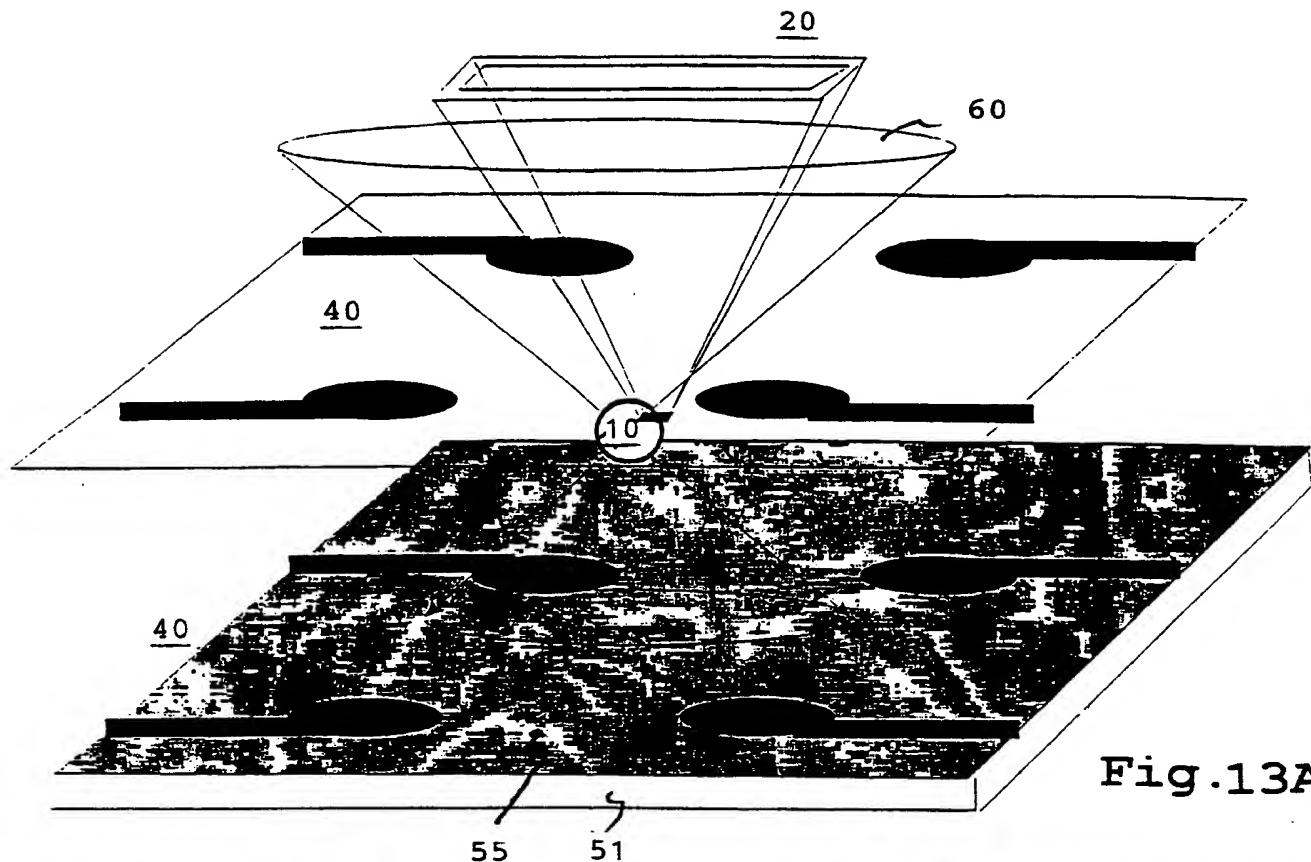


Fig. 12



13/18





14/18

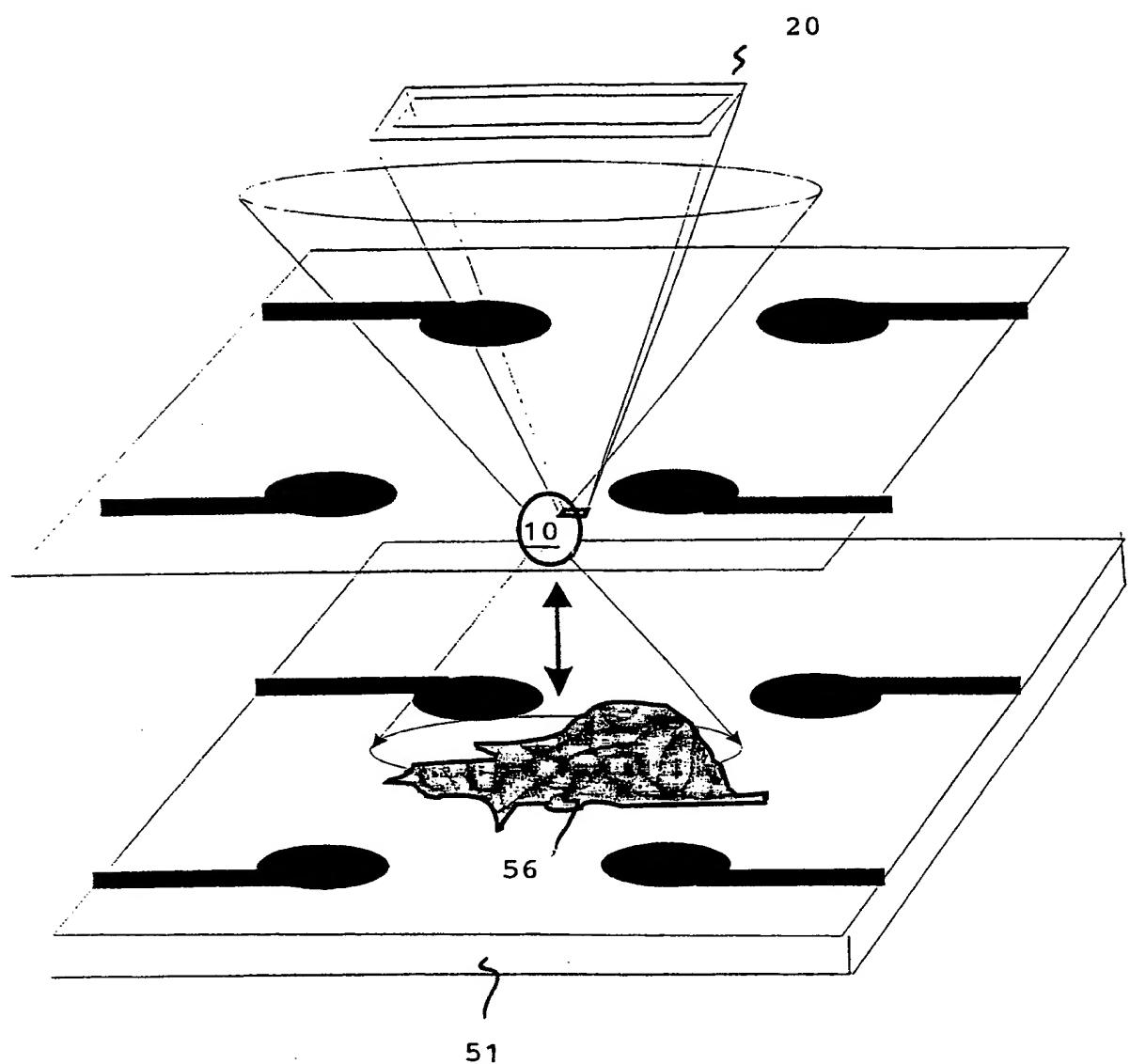
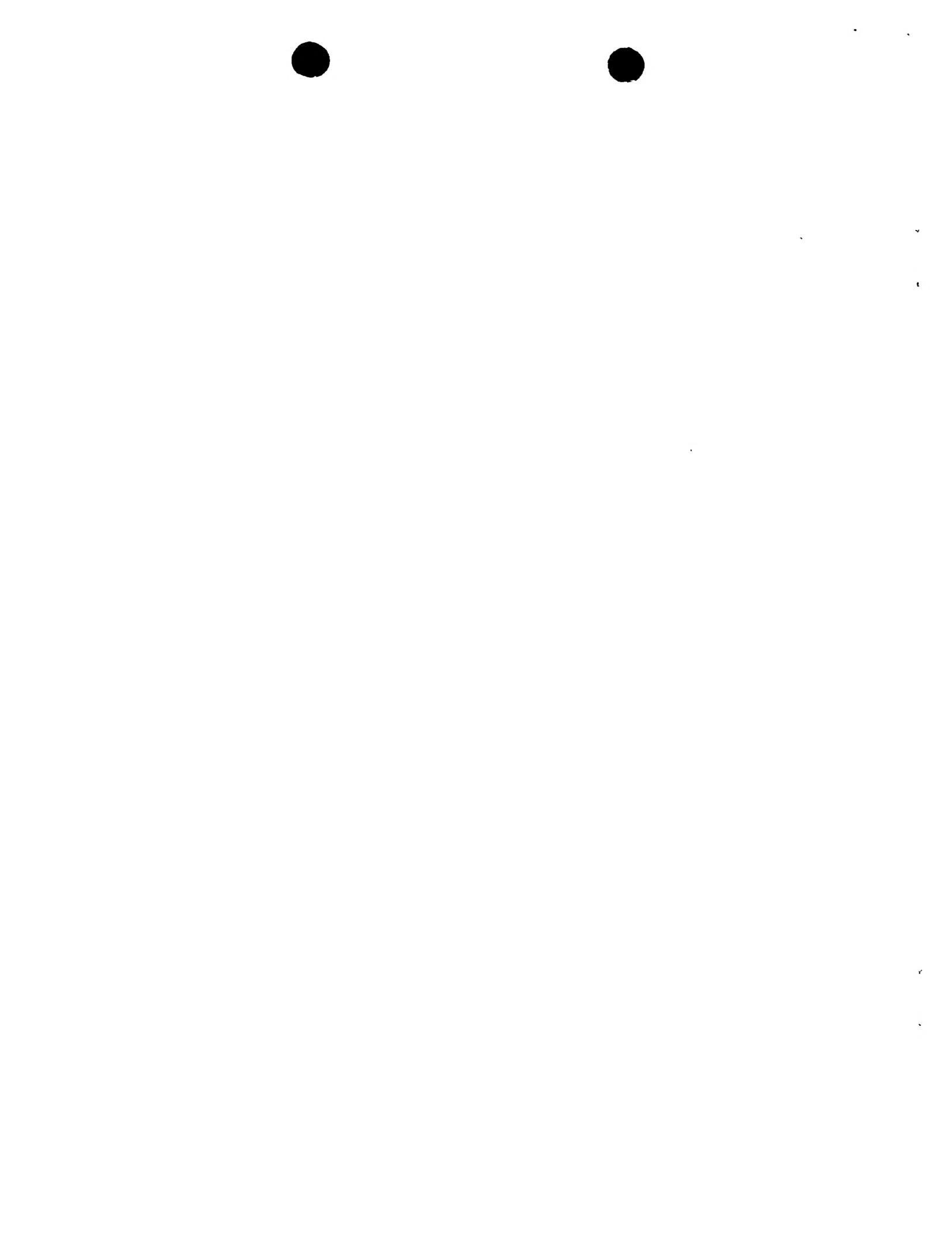


Fig. 14



15/18

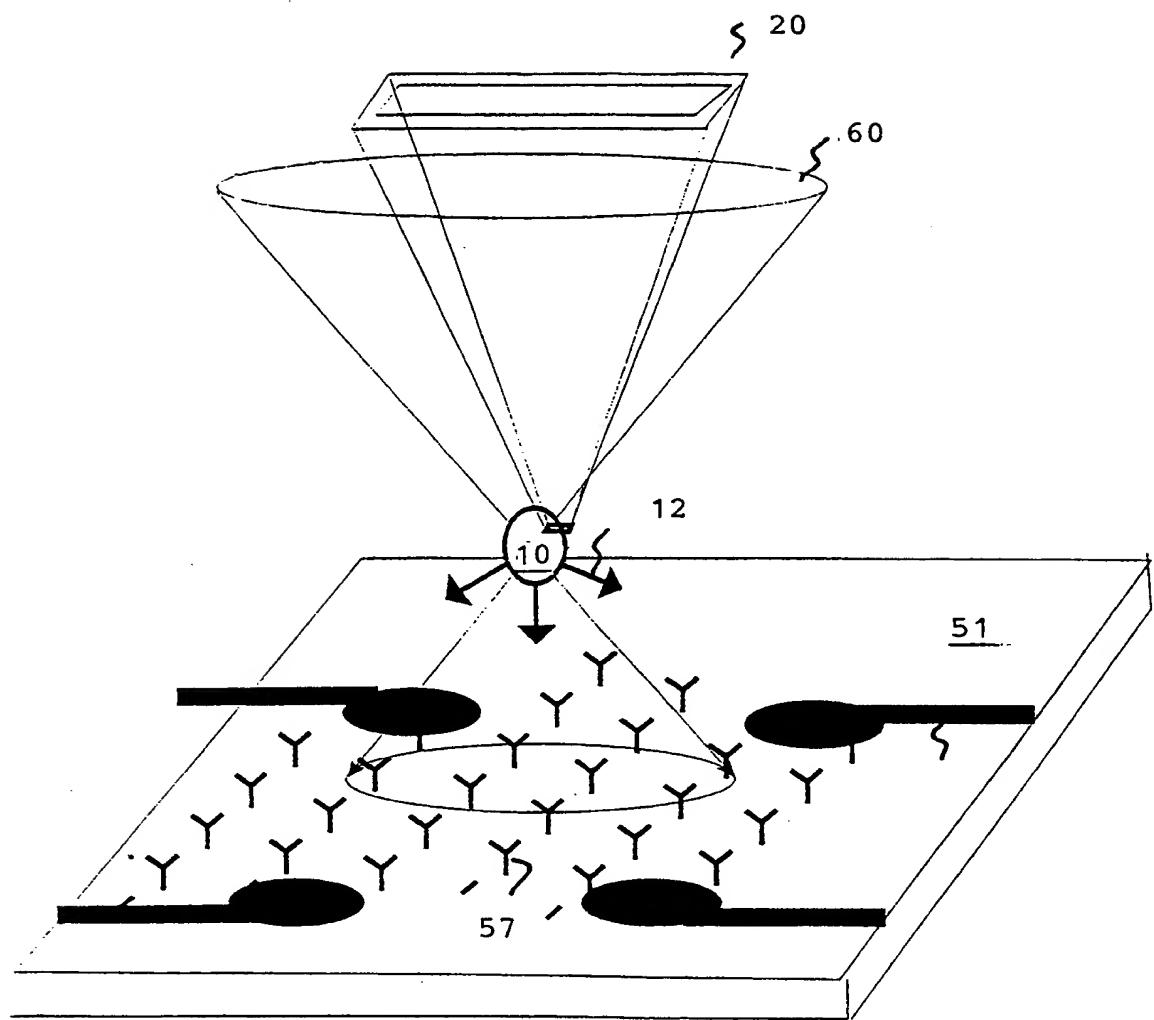
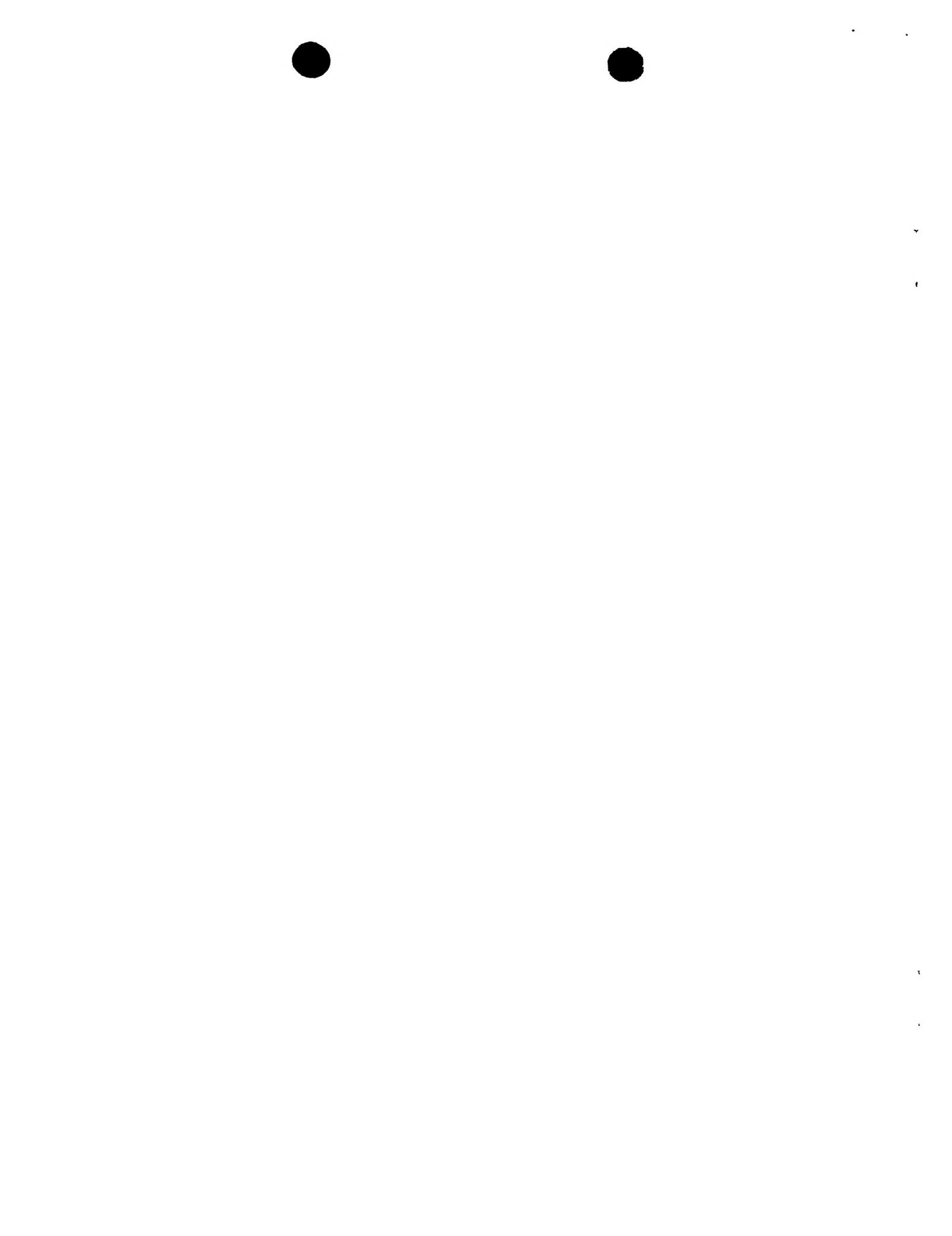


Fig. 15



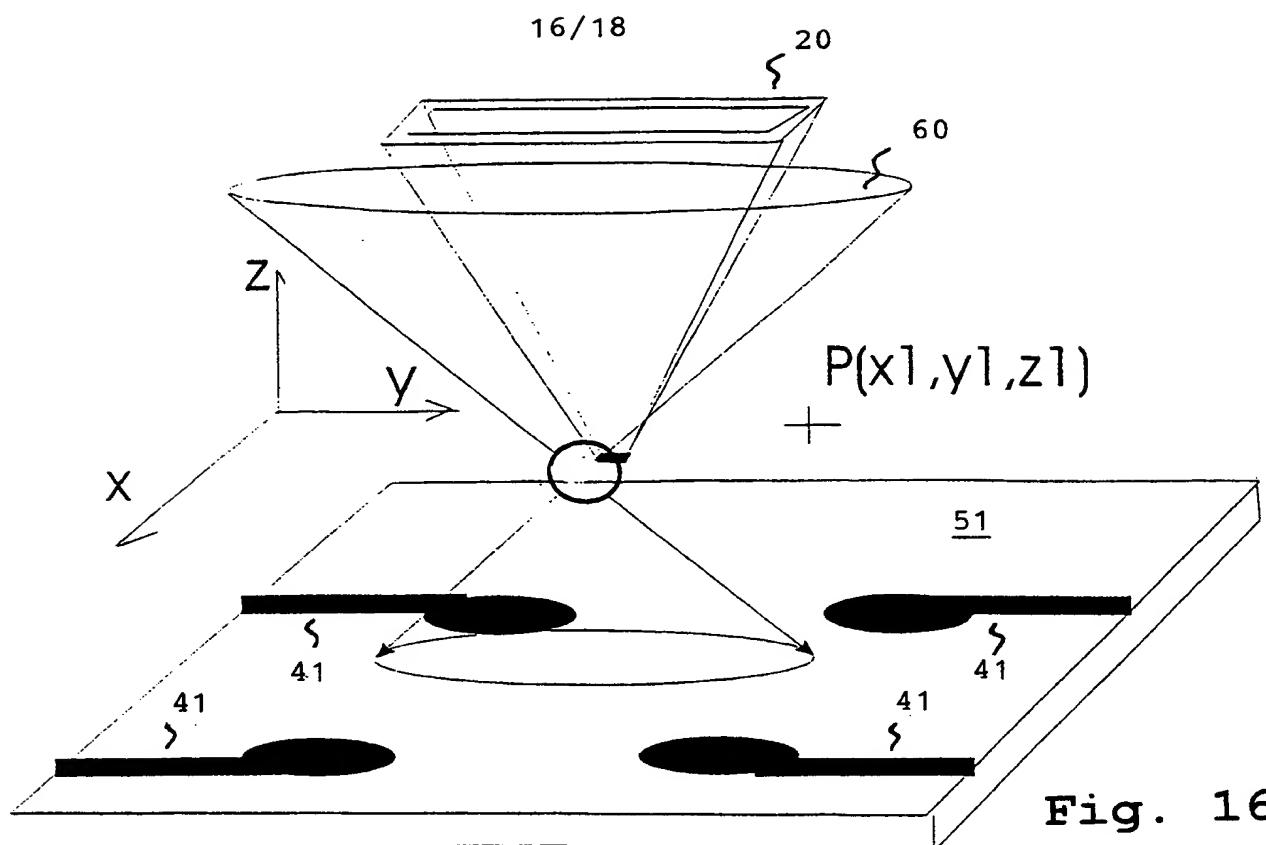


Fig. 16

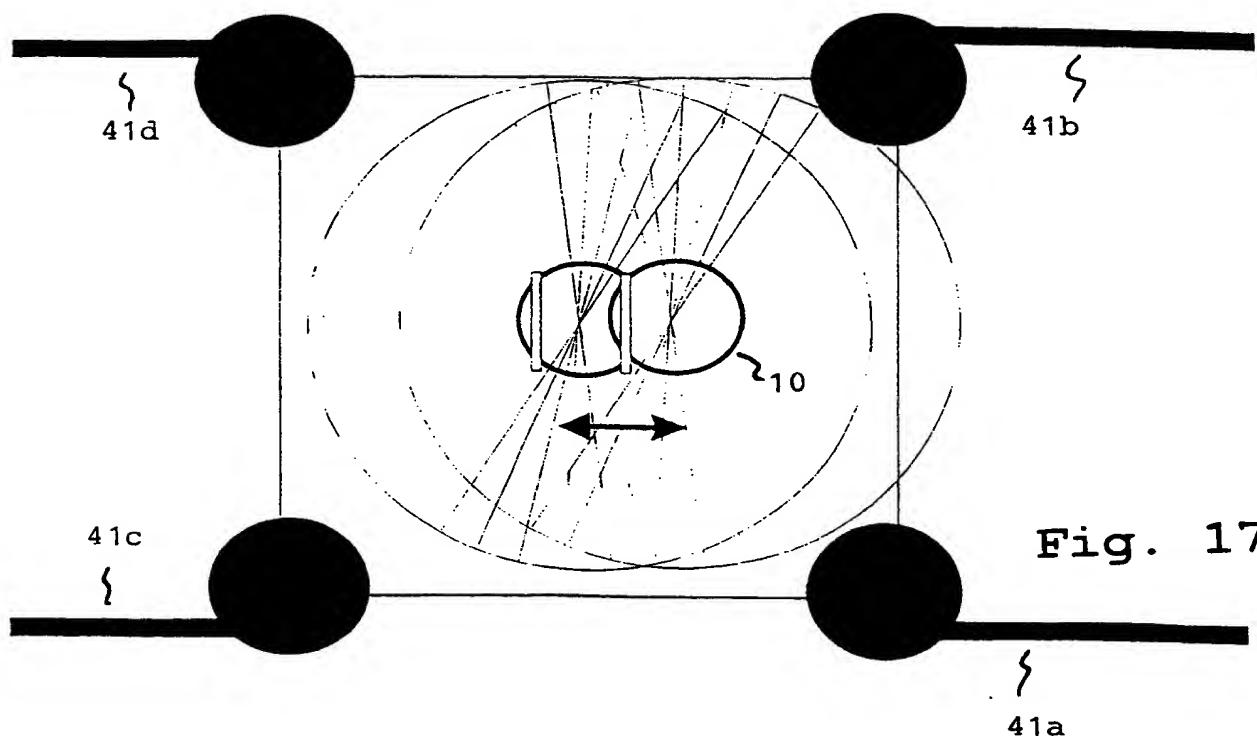
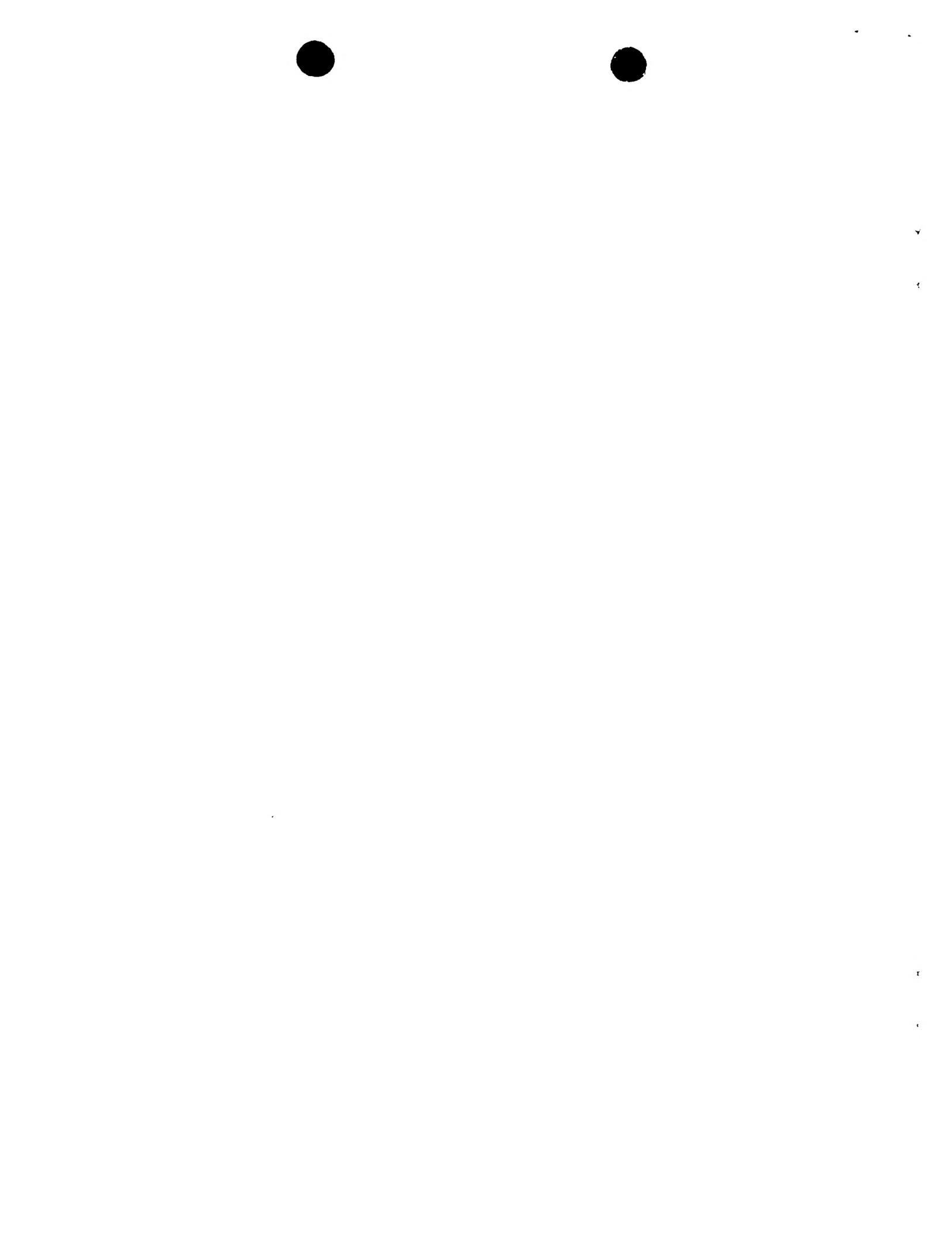


Fig. 17



17/18

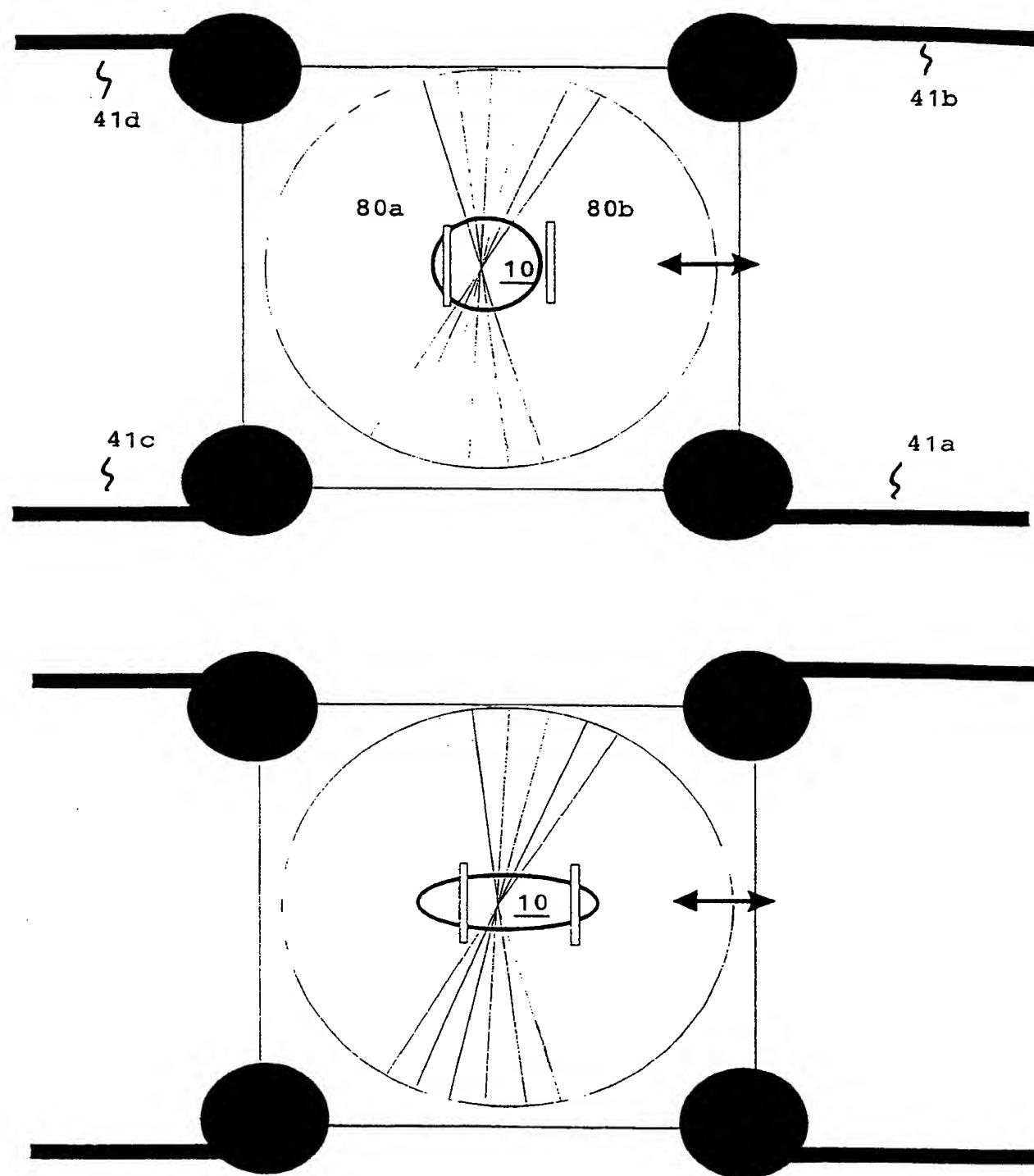
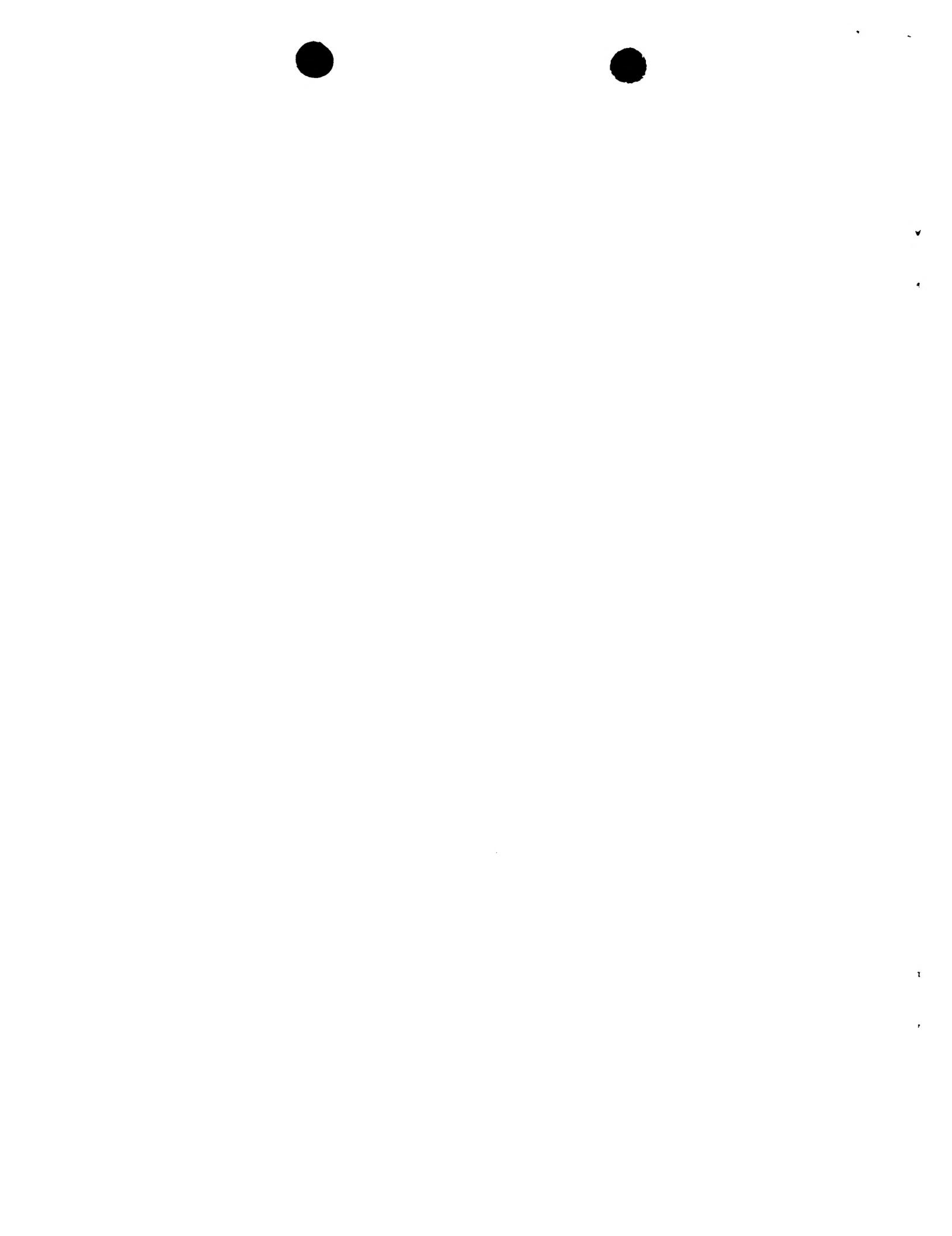


Fig. 18



18/18

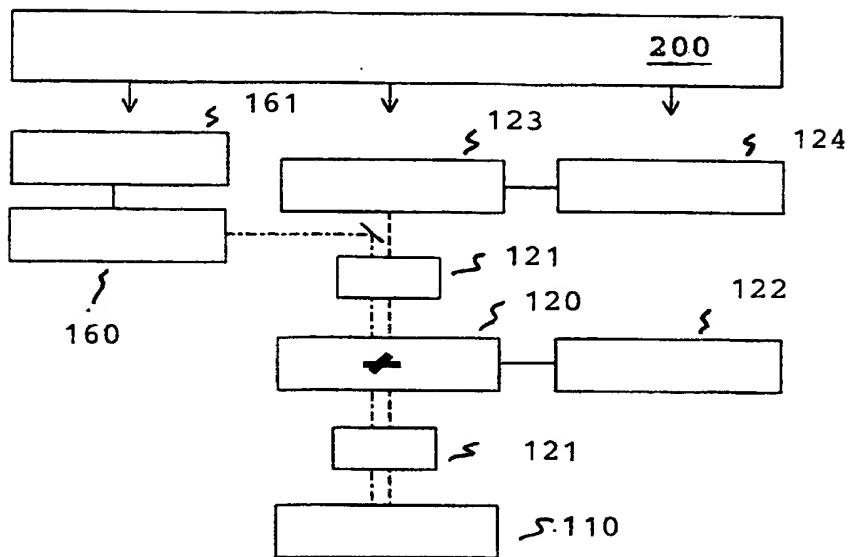
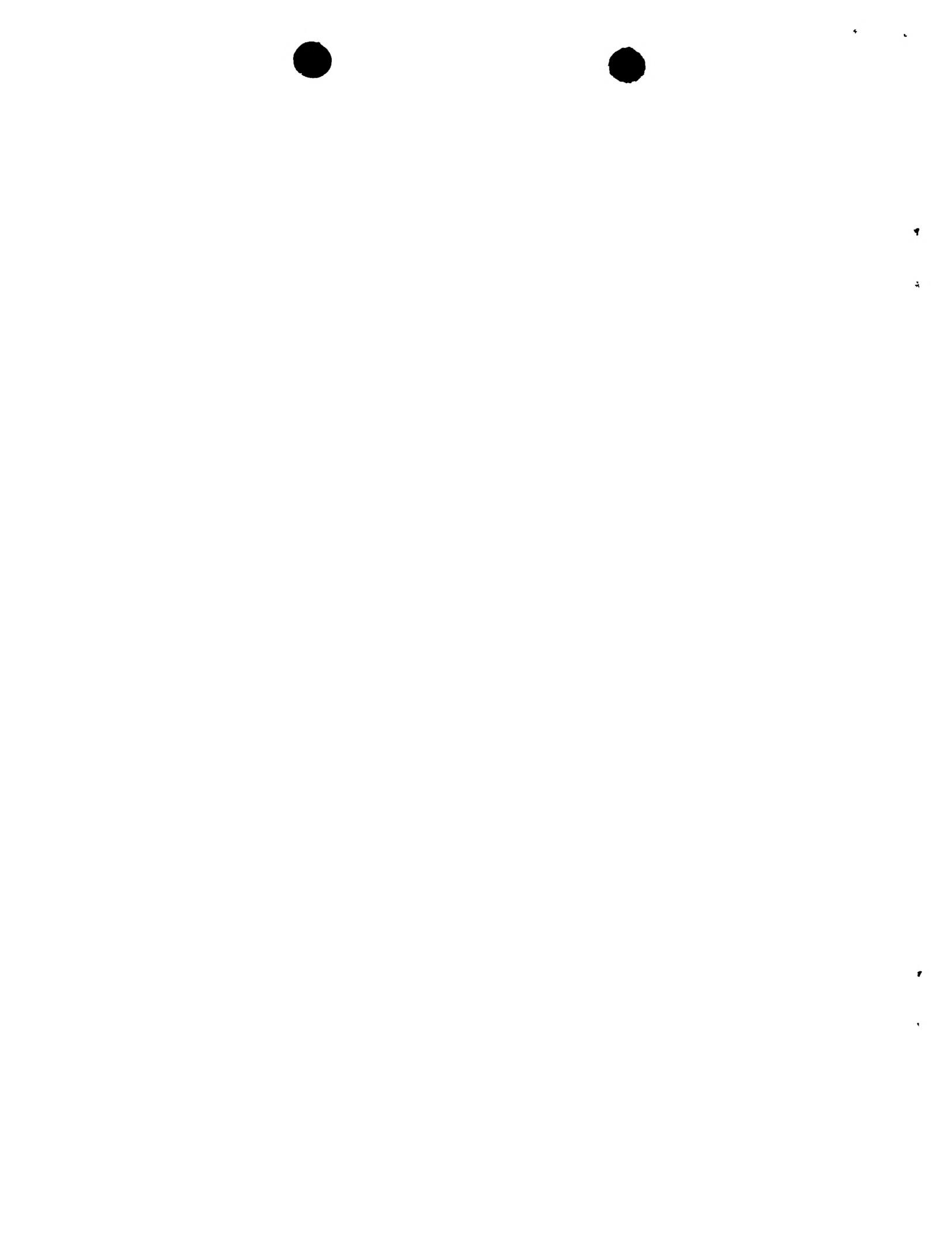


Fig. 19



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter: Aktenzeichen
PCT/EU/00/00621

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N15/14

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 684 587 A (NAQWI AMIR A) 4. November 1997 (1997-11-04) Zusammenfassung ----	1,10,21
A	WO 98 29732 A (FUHR GUENTER ;GLASSER HENNING (DE); SCHNELLE THOMAS (DE); EVOTEC B) 9. Juli 1998 (1998-07-09) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung ----	1,10,21

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. August 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

20/09/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Zinngrebe, U

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

tales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00621

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5684587 A	04-11-1997	KEINE	
WO 9829732 A	09-07-1998	DE 19723873 A	10-12-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/00621

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5684587 A	04-11-1997	NONE	
WO 9829732 A	09-07-1998	DE 19723873 A	10-12-1998

